

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

NEURO-IMAGERIE MULTIMODALE ET MULTIRÉSOLUTION DE CERVEAUX DE  
SOURIS COMBINANT L'HISTOLOGIE SÉRIELLE PAR TOMOGRAPHIE EN  
COHÉRENCE OPTIQUE ET L'IRM DE DIFFUSION

JOËL LEFEBVRE

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

NEURO-IMAGERIE MULTIMODALE ET MULTIRÉSOLUTION DE CERVEAUX DE  
SOURIS COMBINANT L'HISTOLOGIE SÉRIELLE PAR TOMOGRAPHIE EN  
COHÉRENCE OPTIQUE ET L'IRM DE DIFFUSION

présentée par : LEFEBVRE Joël

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. STIKOV Nikola, Ph. D., président

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., membre et directeur de recherche

Mme CHERIET Farida, Ph. D., membre

M. LOMBAERT Hervé, Ph. D., membre externe

## DÉDICACE

*À Thomas, Andréanne et Camille, pour votre présence réconfortante,  
À Jacinthe et Serge, pour avoir cru en tous mes projets, et à  
Laurence, pour ton beau sourire et ton amour.*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Fonds de Recherche du Québec en Nature et Technologies pour le soutien financier accordé durant mes études. Mais surtout je veux remercier les nombreuses personnes m'entourant et qui m'ont supporté, conseillé et encouragé tout au long de mon doctorat.

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Frédéric Lesage qui m'a accueilli dans son laboratoire alors que je n'étais encore qu'un étudiant au bac en génie physique sans expérience en microscopie. Les huit dernières années passées dans son équipe m'ont permis de développer une réelle passion pour la recherche, l'analyse et le développement de la microscopie. Ses grandes connaissances, ses conseils et les encouragements qu'il m'a offerts m'ont permis de me dépasser. Un sincère merci.

Je ne pourrais rédiger des remerciements sans mentionner mes comparses du laboratoire. Particulièrement, je veux remercier Alexandre Castonguay qui au fil des années est devenu un réel ami. Nos projets étaient intimement liés, et sans nos nombreuses discussions et son aide précieuse je n'aurais pas eu la confiance requise pour me plonger dans l'optique. Un grand merci aussi à Patrick Delafontaine-Martel qui a été bon ami et collègue. Sa grande curiosité et son ouverture d'esprit ont été une manne d'idées et une motivation supplémentaire à venir au laboratoire. Merci à Samuel Bélanger pour tous ses conseils et potins au fil des années. Il a été source de cohésion au laboratoire pour plusieurs. Et un grand merci à tous mes collègues pour les cafés, chilis, desserts et toutes les discussions partagées au cours des années.

Et finalement un immense merci à mes amis et ma famille. Vous avez été une source de bonheur et une aide précieuse dans les moments difficiles.

## RÉSUMÉ

L'histologie sérielle est une technique d'imagerie permettant d'observer des échantillons entiers à haute résolution. Cette technique consiste à trancher de fines couches de tissu, puis à déplacer l'échantillon sous un objectif de microscope afin d'acquérir autant d'images que nécessaire pour couvrir toute la surface révélée par la coupe. Ce processus est automatisé et est répété jusqu'à ce que tout l'échantillon soit imagé, c'est-à-dire un cerveau de souris dans cette thèse. Couplée à un microscope par tomographie en cohérence optique (OCT), cette modalité est capable de cartographier la distribution spatiale de la matière blanche dans des cerveaux entiers de souris.

L'objectif principal de cette thèse était de développer les méthodes de reconstruction nécessaires à l'assemblage en un seul volume des milliers d'images acquises par un système d'histologie massive. De plus, dans cette première phase du projet, des méthodes permettant d'aligner les données sur des images IRM acquises pour les mêmes animaux ont été développées. Cela a permis de mieux comprendre l'origine du contraste optique dans le cerveau et cela offre maintenant la possibilité d'intégrer l'histologie massive dans les études de neuro-imagerie employant des groupes d'animaux.

Dans une seconde phase du projet, un microscope à cohérence optique haute résolution a été ajouté au système d'histologie par OCT existant. Cette nouvelle plateforme d'imagerie utilise les images à basse résolution comme repère pour localiser au sein du cerveau les images à haute résolution du second microscope. L'utilité d'une telle plateforme réside dans le fait qu'il est maintenant possible de cibler des régions spécifiques à observer en détail sans avoir à imager un cerveau entier à cette grande résolution, ce qui représenterait plusieurs semaines de mesurage et des quantités immenses de données à assembler. Les données mesurées avec la nouvelle plateforme ont été intégrées à la procédure de reconstruction et d'alignement développé pour la première phase du projet. Ainsi, il a été possible de comparer les images à grande résolution avec les données d'IRM de diffusion acquises pour les mêmes cerveaux de souris. Ceci a permis de confirmer des hypothèses posées lors de l'analyse des données IRM de diffusion à partir de la microscopie.

Les méthodes de reconstruction, d'alignement et d'analyse développées, ainsi que la nouvelle plateforme d'histologie sérielle bi-résolution par OCT, offrent enfin la possibilité d'utiliser cette modalité optique pour réaliser des études de groupes animales ou bien pour valider des mesures faites dans le cerveau avec d'autres modalités d'imagerie telle que l'IRM de diffusion.

## ABSTRACT

Serial histology is an imaging technique able to observe whole samples at high resolution. This technique involves cutting thin tissue layers, followed by the positioning of the sample under a microscope objective and the acquisition of as many images as necessary to cover the entire area revealed by the cut. This process is automated and is repeated until the entire brain has been imaged. Coupled with an optical coherence tomography (OCT) microscope, this modality is able to map the spatial distribution of white matter in whole mouse brains.

The main objective of this thesis was to develop the reconstruction methods necessary for the assembly into a single volume of the thousands of images acquired with a massive histology system. In addition, in this first project phase, methods for aligning data on MRI images acquired for the same animals have been developed. This has led to a better understanding of the optical contrast origin in the brain and it now offers the possibility of integrating massive histology into neuroimaging studies using animal groups.

In a second phase of the project, a high resolution optical coherence microscope was added to the existing OCT histology system. This new imaging platform uses low-resolution images as a reference to locate the high-resolution images of the second microscope within the brain. The usefulness of such a platform lies in the fact that it is now possible to target specific regions to observe in detail without having to image an entire brain at this high resolution, which would represent several weeks for measurements and immense quantities of data to assemble. The data measured with the new platform have been incorporated into the reconstruction and alignment procedure developed for the first phase of the project. Thus, it was possible to compare the high resolution images with the diffusion MRI data acquired for the same mouse brains. This made it possible to confirm hypotheses posed during the analysis of diffusion MRI data.

The methods of reconstruction, alignment and analysis developed during this thesis, as well as the new dual resolution serial OCT histology platform, finally offer the possibility of using this optical modality to carry out studies of animal groups or to validate measurements made in a brain with other imaging modalities such as diffusion MRI.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT .....	VI
TABLE DES MATIÈRES .....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XVII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte et problématique .....	1
1.1.1 Neuro-photonique et histologie sérielle .....	1
1.1.2 Validation de l'IRM de diffusion.....	3
1.2 Objectifs de recherche .....	5
1.2.1 Objectif 1 .....	6
1.2.2 Objectif 2.....	6
1.2.3 Objectif 3.....	7
1.3 Contributions .....	7
1.3.1 Articles de journaux .....	9
1.3.2 Conférences et séminaires .....	10
1.3.3 Outils méthodologiques et données.....	11
1.3.4 Infrastructures de recherche .....	11
1.3.5 Autres .....	11
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	12
2.1 Imagerie optique de la myéline .....	12
2.2 Tomographie en cohérence optique (OCT).....	15
2.2.1 Théorie de l'OCT .....	16
2.2.2 Microscopie par cohérence optique (OCM).....	21
2.3 Origine du contraste en OCT .....	24
2.3.1 Modèles d'interaction à une seule diffusion .....	27
2.3.2 Modèles d'interaction à plusieurs diffusions .....	30

CHAPITRE 3	MÉTHODOLOGIE.....	33
3.1	Microscope OCT bi-résolution.....	33
3.1.1	Interféromètre de Michelson fibré.....	33
3.1.2	Bras d'échantillon 3X et 40X.....	34
3.1.3	Bras de référence.....	36
3.1.4	Automatisation.....	37
3.1.5	Reconstruction des données.....	37
3.1.6	Caractérisation de l'OCT.....	40
3.2	Système d'histologie sérielle basée sur l'OCT.....	41
3.2.1	Préparation des tissus.....	43
3.2.2	Acquisition.....	45
3.2.3	Reconstruction des données.....	49
3.3	IRM de diffusion.....	52
3.4	Analyse multimodale.....	54
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 : WHOLE MOUSE BRAIN IMAGING USING OCT: RECONSTRUCTION, NORMALIZATION, SEGMENTATION AND COREGISTRATION TO DIFFUSION MRI .....	57
4.1	Introduction.....	58
4.2	Methods.....	60
4.2.1	Tissue Preparation.....	60
4.2.2	dMRI Acquisition.....	60
4.2.3	SS-OCT and Image Acquisition.....	61
4.2.4	Volume Reconstruction.....	63
4.2.5	Optical Attenuation Estimation.....	66
4.2.6	OCT Brain Template Creation.....	69
4.2.7	OCT Brain Image Segmentation.....	70
4.2.8	OCT and dMRI Coregistration and Comparison.....	71
4.3	Results.....	72
4.3.1	Volumes Acquisition and Reconstruction.....	72
4.3.2	Attenuation Coefficients Estimation.....	74
4.3.3	Correlation Between dMRI and OCT.....	76



4.3.4	Tissue Segmentation .....	78
4.4	Discussion .....	80
4.5	Conclusion.....	83
4.6	References .....	84
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: FULLY AUTOMATED DUAL-RESOLUTION SERIAL OCT AIMED AT DMRI VALIDATION IN WHOLE MOUSE BRAINS.....		93
5.1	Introduction .....	94
5.2	Methodology .....	97
5.2.1	Animal Sacrifice and Tissue Preparation .....	97
5.2.2	Diffusion MRI Acquisition and Analysis.....	97
5.2.3	Dual Resolution Swept-Source Serial OCT .....	100
5.2.4	Whole Brain OCT Volume Reconstruction .....	103
5.2.5	Dual-Resolution Acquisition and Reconstruction.....	104
5.2.6	Multimodal and Multiresolution Registration.....	105
5.2.7	Multimodal Signal Comparison .....	107
5.3	Results .....	109
5.3.1	2R-SOCT Imaging System Characterization .....	109
5.3.2	Dual-Resolution Acquisitions .....	110
5.3.3	Comparison Between the dMRI and 2R-SOCT .....	114
5.4	Discussion .....	119
5.5	Conclusion.....	122
5.6	References .....	123
5.7	Appendices .....	131
5.7.1	Appendix A: Stereotactic Correspondence between the 3X and 40X OCT .....	131
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE .....		133
6.1	Objectif 1 .....	134
6.2	Objectif 2 .....	136
6.3	Objectif 3 .....	138
CHAPITRE 7 CONCLUSION .....		140
BIBLIOGRAPHIE .....		141

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 3.1 Distances optimisées des composants du microscope .....	35
---	----

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Aperçu du pipeline d'un pipeline d'imagerie développé par le Allen Brain Institute pour cartographier le connectome au sein d'un cerveau de souris entier. Reproduction de la figure 1 de (Oh et al., 2014b).....	3
Figure 2.1 Nombre de publications par année mentionnant le mot clé «OCT » et principaux domaines d'application de cette modalité. Données et images issues du site web « WebOfScience » (Reuters, 2012).....	16
Figure 2.2: Représentation schématique d'un OCT basé sur un interféromètre de Michelson. Reproduction de la figure 2.3 de (Izatt et al., 2015).....	17
Figure 2.3 Limites de résolution de l'OCT pour un faible et un grand NA. Adapté de la figure 9.1 de (Drexler & Fujimoto, 2015) .....	22
Figure 2.4 Résolutions caractéristiques d'un FD-OCT dans l'air ( $n=1$ ) en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif pour une source gaussienne ( $\lambda_0 = 1310nm$ , $\Delta\lambda = 100nm$ ) .....	23
Figure 2.5 Diagramme de Jablonsky représentant l'absorption d'un photon et plusieurs mécanismes de relaxations possibles. Adapté de la figure 1.2 de (L. V. Wang & Wu, 2007) .....	24
Figure 2.6 Fonction de phase d'Henye-Greenstein.....	27
Figure 2.7 (A) Étalement d'un point focal avec la profondeur due à la diffusion multiple dans les tissus. (B) Facteur d'efficacité hétérodyne obtenu pour la rétrodiffusion considérant l'effet « rideau de douche » (bleu), une réflexion spéculaire (orange), une rétrodiffusion sans effet « rideau de douche » (vert), et une rétrodiffusion à un seul événement de diffusion (rouge). Adaptation des figures 2.3 et 2.4 de (Andersen et al., 2008) .....	32
Figure 3.1 Schéma complet du système d'histologie sérielle basé sur l'OCT bi-résolution. Les régions vertes indiquent les éléments optiques qui ont été ajoutés au SOCT existant pour obtenir l'OCM. Figure adapté de l'article 2 présenté au.Chapitre 5. ....	33
Figure 3.2 Représentation schématique du bras échantillon. Les distances ne sont pas à l'échelle. ....	36
Figure 3.3 Exemple du signal envoyé aux miroirs galvanométriques. Les mesures des franges d'interférence (indiquée par la variable « gate ») sont seulement faites durant la partie linéaire du mouvement de l'axe rapide. ....	38

Figure 3.4 Représentation schématique de l'assemblage d'un volume OCM par la méthode de fusion de Gabor. La position des plans focaux (lignes rouges pointillées) est utilisée pour calculer les poids de mélange (trapèzes bleus) pour chaque volume OCT. ....	40
Figure 3.5 Système d'histologie par OCT bi-résolution. (A) Disposition des moteurs linéaires. (B) Vibratome en fonction. (C) Disposition des composants du système d'imagerie. Les régions de couleurs indiquent la position du vibratome (bleu), de l'OCT 40X (rouge), de l'OCT 3X (vert) et du miroir motorisé utilisé pour changer d'OCT (orange). ....	42
Figure 3.6 Préparation des tissus. (A) Crâne de souris nettoyé, (B) Crâne de souris dans le support à échantillon pour l'IRM, (C) Antenne IRM, (D) Positionnement d'un cerveau pour le bloque d'agarose, (E) Solidification de l'agarose, (F) Agarose oxydé et (G) Imbrication de l'agarose oxydé dans un bloc d'agarose non-oxydé. ....	45
Figure 3.7 Serveur Jupyter Notebook servant à contrôler et documenter les séances d'acquisition 2R-SOCT.....	46
Figure 3.8 Sélections manuelle (A) et automatique (B) des ROIs 40X pour une tranche de cerveau de souris. (Rouge) ROIs de type OCM, (Vert) ROI de type mosaïque.....	48
Figure 3.9 Exemples de coregistration utilisée pour calibrer les moteurs du support à échantillon. (A) Image initiale, (B) Image après un déplacement d'environ 2mm vers la gauche, (C) images alignées par corrélation de phase. ....	51
Figure 3.10 Étapes d'une acquisition IRM. (A) Échantillon placé dans une seringue étanche et antenne (B) Dégazage de la fomme, (C) porte-échantillon, (D) agrandissement du porte-échantillon contenant la seringue étanche, (E) Interface de contrôle VnmrJ et d'une séquence de sonde pour repérer le crâne de souris, (F) Machine IRM 7T. ....	53
Figure 3.11 Transformations linéaires 2D. Reproduction de la figure 2 de l'article (Szeliski, 2006) .....	55
Figure 4.1 (a) Main components of the serial massive histology setup. (b) Parameters of the motor displacement model. (c) Volume rendering of a reconstructed brain (visualization made with the Blender software (Blender Online Community, 2016). ....	62
Figure 4.2 Laplace blending example. (a) A tile $I(x, y)$ (red) is added to the mosaic $M(x, y)$ (blue). The Laplace equation is solved over the overlap area (violet). (b) Laplace blending weights solved for this geometry. The contour lines traced inside the overlap area indicate the extent of the modified blending weights for different values of the blending width parameter $w$ ...	65

- Figure 4.3 (a) Example of an axial PSF extraction from an average A-line within agarose. (b) Schematic of the A-line signal extrapolation method used to reduce attenuation coefficients biases. (c) AIPs over  $250\text{ }\mu\text{m}$  of a horizontal slice from a reconstructed mouse brain. (Left) original OCT reflectivity contrast, (middle) reflectivity contrast compensated for the depth-dependent signal attenuation, and (right) the computed attenuation coefficient map. The white arrow indicates the direction of the MOA. The tissue was cut along the coronal plane with the cerebellum facing the microscope. ....68
- Figure 4.4 (a) Horizontal slices of the OCT reflectivity brains used for the template creation. (b) Mirrored version of the brain shown in (a) that were also used by the template creation algorithm. (c) Resulting OCT reflectivity brain template after  $M = 20$  iterations. All brains were downsampled to an isotropic resolution of  $50\text{ }\mu\text{m}$  per voxel. ....69
- Figure 4.5 Example of the multimodal registration algorithm. The OCT brain template generated in this work and a publicly available dMRI mouse brain template (Jiang & Johnson, 2010) were used as intermediary registration templates. Each arrow indicates the registration of a given volume onto another (for example the OCT brain was mapped to the OCT brain template and then mapped to the Allen mouse brain). ....72
- Figure 4.6 (a) AIP of an OCT reflectivity tissue slice reconstructed at the original anisotropic sampling resolution of  $4.8 \times 4.8 \times 6.5\text{ }\mu\text{m}^3$ . Neither the axial PSF nor the XY vignetting effect were compensated for in this example to better represent the raw data aspect. Each volumetric tile has a field of view of  $2.5 \times 2.5 \times 0.8\text{ mm}^3$  and an overlap with their neighbors of around  $0.5\text{ mm}$ . The arrows indicate the mammillothalamic tracts (red), the columns of the fornix (blue), and the corpus callosum and the striatum (green). (b) Coronal, sagittal, and horizontal slices within the delineated yellow region in (a), showing fibers in the striatum and the corpus callosum. The tissue was sliced along the coronal plane, with the cerebellum facing the microscope objective. ....73
- Figure 4.7(a) Scatterplot of the OCT reflectivity and attenuation contrasts by tissue classes obtained from the OCT brain template segmentation results. For each label,  $N = 750$  sample voxels were selected randomly. (b) Average FA computed for each segmented tissue label. (c) OCT reflectivity and (d) attenuation coefficient histograms per tissue classes. The average values per label are expressed as  $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ . The label colors are the same as shown in Figure 4.9. ....75

Figure 4.8 Correlation between the dMRI metrics and the OCT contrasts. The average reflectivity (a) and attenuation coefficient (d) are plotted as a function of FA for different fiber bundle orientations. Also, these OCT contrasts are reported as a function of the angle between the fibers and the direction of the MOA (b), the AFD\_max (e), and the number of fibers orientations within a voxel (NuFO, f). The error intervals represent the standard error of the mean ( $\sigma/N$ ). (c) Main tissue orientations given by the dMRI acquisition. The white arrow represents the direction of the MOA given by coregistering the assembled brain with the FA volume. The average values in (e) and (f) were computed within the fiber bundles only by imposing a threshold of  $FA > 0.4$ . ..... 77

Figure 4.9 Five-tissue segmentation results using an OCT/attenuation mouse brain template ( $n = 4$ ). (a)–(c) A coronal slice and (d)–(f) a horizontal slice. (a) and (d) The OCT reflectivity contrast, (b) and (e) the estimated attenuation coefficients, and (c) and (f) the segmentation results for the same slices. The white arrow indicates the direction of the MOA. The red and green arrows in (d) point to the temporal and olfactory limbs of the anterior commissure, respectively. The green and yellow labels represent white matter fiber bundles parallel and orthogonal to the MOA, the dark and light-blue labels contain mostly gray matter tissues, and the red label represents other tissues with high myelin content (e.g., medulla, pons, and midbrain). ..... 79

Figure 5.1 Main components of the dual-resolution serial OCT setup. FC: Fiber coupler, COL: Collimator, PC: Polarization Controller, BPD: Balanced Photodetector, FM: Motorized flip mirror, DCC: Dispersion Compensation Cube, ODC: Objective Dispersion Compensator, ND: Variable Neutral Density Filter, M: Mirror, ADC: Analog-Digital Converter, FPGA: Field-programmable Array, DAQ: Data acquisition Card. .... 101

Figure 5.2 Multimodal and multiresolution coregistration workflow. In this illustration, all templates are shown at a resolution of 25 microns, the 3X OCT slice is at a resolution of 15 microns, the 40X OCM images are at a resolution of 1 micron and the FA map is shown at a resolution of 125 microns. .... 107

Figure 5.3 Multimodal signal comparison performed between the 2R-SOCT and the dMRI data. The 3X SOCT (Green) is used to image a whole mouse brain that serves as a stereotactic reference to locate the 40X ROIs (red) within the dMRI volumes (blue). Scale bar: 2mm. 108

Figure 5.4 Dual resolution OCT characterization. (A) USAF1951 resolution target measured with the 3X arm. The last visible group element was G5E6. (B) Average b-scan of the OCT

phantom PSF pattern. The red dots indicate the position of the detected PSF. The plots are the lateral and axial PSF profiles extracted from the image and the inset is the fitted PSF. These measures were done with the 3X arm. (C) USAF1951 resolution target measured with the 40X arm. All acquisitions were done in water. .... 109

Figure 5.5 Example of a dual resolution fixed-focus mosaic acquisition. (A) Manual selection of the region of interest to be imaged (Green polygon) (B) 3X OCT mosaic acquired at the defined ROI position. (C) Same region acquired with the 40X objective. Each mosaic tiles have a FOV of  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$  and an overlap of 20%. Scale bar: 250 microns. .... 110

Figure 5.6 Dual resolution OCT acquisition showing the corpus callosum and cingulate bundle in a mouse brain. (A) Low resolution OCT volume used to target the high resolution ROI (red rectangle). (B) Maximum intensity projection and (C) Average intensity projection of the high-resolution OCM volume acquired. (D) Average intensity projections over 30 microns of the OCM volume. The scale bars are of size 0.5 mm for the 3X image and 100 microns for the 40x image. .... 112

Figure 5.7 Automated 40X OCT ROIS generation method. (A) Average intensity projection of a 3X OCT mouse brain tissue slice, (B) Tissue mask and 0.25mm margin from the Agarose/Tissue boundary (red line), (C) Probability bias used to guide the random ROI generation. (D) 25 ROIs of shape  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$  generated for this slice. (E) 3D rendering of the 40X ROIs (red) generated for an automated 2R-SOCT. .... 113

Figure 5.8 Average intensity projections of the dual-resolution ROIs acquired automatically within a single mouse brain. (Left) OCT ROIs acquired with the low-resolution 3X objective and (Right) the same OCM ROIs acquired with the high-resolution 40X objective. Each ROI is of size  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ . .... 114

Figure 5.9 3D rendering of all 40X ROIs of this study from three 2R-SOCT mouse brain acquisitions. All ROI overlay volumes were aligned to an OCT mouse brain template, shown here as a grayscale average intensity. The ROI position of the blue and red blocks were selected automatically by the 2R-SOCT ROI selection method, and the green blocks were selected manually by the microscope operator. This is a still frame from the video. (Video1, MP4, 2.2 MB). .... 115

Figure 5.10 Examples of 40X ROIs associated with low and high dMRI metric values. Each image spans a FOV of  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$  and is an average intensity projection over 250 microns. The

yellow annotations indicate the brain structures and their volume fraction within the ROIs. The acronyms follow the Allen Mouse Brain convention. (RSP): Retrosplenial Area, (cing): Cingulum Bundle, (SF): Septofimbrial Nucleus, (TRS): Triangular Nucleus of Septum, (fi): Fimbria, (cc): Corpus Callosum, (dhc): Dorsal Hippocampal Commissure, (GRN): Gigantocellular Reticular Nucleus, (PRNc): Pontine Reticular Nucleus, Caudal part, (tspc): Crossed Tectospinal Pathway, (SSs): Supplemental Somatosensory Area, (SSp): Primary Somatosensory Area, (CP): Caudoputamen, (ec): External Capsule, (aco): Anterior Commissure, olfactory limb, (act): Anterior Commissure, temporal limb, (HY): Hypothalamus, (ccg): Genu of the Corpus Callosum, (fa): Corpus callosum, Anterior Forceps, (STR): Striatum, (SH): Septohippocampal Nucleus, (IG): Induseum Griseum, (EPI): Epithalamus, (DG-mo): Dentate Gyrus - Molecular Layer, (DB-sg): Dentate Gyrus – Granule Cell Layer, (sm): Stria Medullaris, (MB): Midbrain, (dscp): Superior Cerebellar Peduncle Decussation, (mtg): Mammilotegmental Tract, (dtd): Doral Tegmental Decussation, (tspc): Crossed Tectospinal Pathway..... 117

Figure 5.11 Comparison between simple OCM image features the dMRI metrics. Each histogram represents the OCM values classified within the low (blue) and high (orange) dMRI metric quantiles. The red stars indicate significant differences obtained from a T-test between all pairs of Low/High metric values, corrected for multiple comparisons ( $p < 0.0025$ ). ..... 119



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2R-SOCT	OCT sériel birésolution ( <i>Dual-resolution serial OCT</i> )
3D	Tridimensionnel
AD	Diffusivité axiale ( <i>Axial Diffusivity</i> )
ADC	Convertisseur Analogue Digital ( <i>Analog Digital Converter</i> )
AFD	Densité apparente des fibres ( <i>Apparent Fiber Density</i> )
AFD_max	AFD maximum
AIP	Projection moyenne des intensités ( <i>Average Intensity Projection</i> )
AMICO	<i>Accelerated Microstructure Imaging via Convex Optimization</i>
ANTs	<i>Advanced Normalization Tools</i>
BIC	Critère d'information Bayésien ( <i>Bayesian Information Criterion</i> )
BOLD	<i>Blood Oxygenation Level Dependent</i>
BPD	Photodétecteur balance ( <i>Balanced Photodetector</i> )
CARS	<i>Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy</i>
CCF	<i>Common Coordinate Framework</i>
COL	Collimateur
COM	Port de communication
CSF	Fluide céphalo-rachidien ( <i>Cerebrospinal fluid</i> )
CT	Tomodensitométrie ( <i>Computed Tomography</i> )
DAQ	Carte d'acquisition de données ( <i>Data acquisition card</i> )
DC	Composante continue
DCC	<i>Dispersion compensation cube</i>
dMRI	IRM de diffusion ( <i>Diffusion MRI</i> )
DTI	Imagerie du tenseur de diffusion ( <i>Diffusion Tensor Imaging</i> )
DWI	Image pondérée par la diffusion ( <i>Diffusion Weighted Image</i> )
EHF	<i>Extended Huygens-Fresnel Theory</i>
FA	Anisotropie fractionnelle ( <i>Fractional Anisotropy</i> )
FC	Coupleur de fibre ( <i>Fiber coupler</i> )
FD-OCT	OCT dans le domaine de Fourier ( <i>Fourier Domain OCT</i> )
FFOCT	OCT plein champ ( <i>Full-Field OCT</i> )
FIB	Faisceau d'ions focalisé

FM	<i>Motorized Flip Mirror</i>
fMRI	IRM fonctionnel ( <i>Functional MRI</i> )
fNIRS	<i>Functional Near-Infrared Spectroscopy</i>
fODF	<i>Fiber Orientation Distribution Function</i>
FOV	Champ de vue ( <i>Field of view</i> )
FPGA	<i>Field-Programmable Array</i>
FTP	<i>File Transfer Protocol</i>
FWHM	Largeur à mi-hauteur ( <i>Full Width at half maximum</i> )
GFP	Protéine fluorescente verte ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GL	Couche granulaire ( <i>Granular Layer</i> )
GMM	<i>Gaussian Mixture Model</i>
GUI	<i>Graphical User Interface</i>
HARDI	<i>High Angular Resolution Diffusion Imaging</i>
IC_VF	<i>Intracellular Volume Fraction</i>
IOI	Imagerie Optique Intrinsèque
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMd	IRM de diffusion
ISAM	<i>Interferometric Synthetic Aperture Microscopy</i>
MC-OCT	<i>Multi-contrast OCT</i>
MD	Diffusivité moyenne ( <i>Mean diffusivity</i> )
ML	Couche moléculaire ( <i>Molecular Layer</i> )
MOA	Axe optique du microscope ( <i>Microscope Optical Axis</i> )
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NA	Ouverture numérique ( <i>Numerical Aperture</i> )
ND	Filtre atténuateur ( <i>Neutral density filter</i> )
NODDI	<i>Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging</i>
NuFO	<i>Number of Fiber Orientations</i>
OCM	Microscopie en cohérence optique ( <i>Optical Coherence Microscopy</i> )
OCT	Tomographie en cohérence optique ( <i>Optical Coherence Tomography</i> )
OD	Dispersion des orientations ( <i>Orientation Dispersion</i> )
ODC	<i>Objective Dispersion Compensator</i>

ODF	<i>Orientation Distribution Function</i>
PBS	Tampon phosphate salin ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PC	Contrôleur de polarisation ( <i>Polarization controller</i> )
PET	Tomographie par émission de positrons ( <i>Positron emission tomography</i> )
PFA	Paraformaldéhyde
PSF	Fonction d'étalement du point ( <i>Point-spread function</i> )
PSOCT	OCT sensible à la polarisation
RAID6	<i>Redundant Array of Independent Disks</i>
RAM	Mémoire vive ( <i>Random Access Memory</i> )
RD	Diffusivité radiale ( <i>Radial Diffusivity</i> )
ROI	Région d'intérêt ( <i>Region of Interest</i> )
RTT	<i>Radiative Transfer Theory</i>
SDK	<i>Software Development Kit</i>
SDOCT	<i>Spectral Domain OCT</i>
SEM	Erreur type ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
SOCT	OCT sériel ( <i>Serial OCT</i> )
SPECT	<i>Single-photon emission computed tomography</i>
SSOCT	<i>Swept-source OCT</i>
SyN	<i>Symmetric Image Normalization Method</i>
TD-OCT	<i>Time-Domain OCT</i>

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

### 1.1 Contexte et problématique

La neuro-imagerie est définie par l'Office québécois de la langue française comme étant « l'ensemble des méthodes d'imagerie médicale qui sont utilisées pour obtenir de l'information sur la structure ou le fonctionnement du cerveau à des fins diagnostiques, thérapeutiques ou de recherche ». Quelques méthodes de neuro-imagerie utilisées en clinique sont la tomodensitométrie par rayon X (CT), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la gammatomographie (SPECT), la tomographie par émission de positrons (PET) et l'échographie par ultrason (Filippi, 2015). L'IRM se décline en plusieurs types de séquence, chacune sondant des aspects différents du cerveau (Filippi, 2015). Parmi les séquences il y a l'imagerie des temps de relaxation T1 et T2 ou des densités de protons, la spectroscopie par résonance magnétique mesurant les composants neurochimiques, l'imagerie de la diffusion de l'eau servant d'indicateur pour cartographier les fibres de matières blanches, l'imagerie du transfert de magnétisation qui combinée avec différents modèles, permet de sonder la microstructure des tissus, l'imagerie de la perfusion cérébrale, et l'imagerie fonctionnelle (fMRI) qui exploite l'effet BOLD (*Blood Oxygenation Level Dependent*) pour inférer l'activation des régions du cerveau sous certaines tâches.

#### 1.1.1 Neuro-photonique et histologie sérielle

En plus des techniques de neuro-imagerie clinique, plusieurs nouvelles modalités optiques peuvent être utilisées et offrent de meilleures résolutions spatiales et temporelles, ou des informations complémentaires à ce qui peut être imagé avec les méthodes conventionnelles. L'ensemble des méthodes d'imagerie du cerveau utilisant la lumière est réuni au sein du domaine de la neuro-photonique. L'imagerie optique est un outil fréquemment utilisé pour étudier le cerveau *in vivo* (Hillman, 2007). Par exemple, l'imagerie optique intrinsèque (IOI) permet de visualiser les changements de propriétés optiques à la surface de cerveaux à nu, ce qui est ensuite lié à des cartes d'activation des régions corticales par des modèles physiologiques de l'origine du signal. L'imagerie fonctionnelle par spectroscopie en proche infrarouge (fNIRS) mesure les modifications de volumes sanguins dans le cerveau pour inférer l'activation neuronale locale par un modèle du couplage neurovasculaire. Le fNIRS est le pendant optique de l'imagerie IRM fonctionnelle BOLD qui est fréquemment utilisée en neuropsychologie. Le réseau vasculaire cérébral peut également

être étudié *in vivo* avec la microscopie confocale par fluorescence et la microscopie 2-photons en injectant un colorant fluorescent dans le sang puis en imageant directement la surface du cerveau suite à une craniectomie. Ceci permet d'obtenir le réseau de capillaires du néocortex en 3-dimensions et d'observer ses propriétés physiologiques, anatomiques et topologiques pour différentes maladies ou au cours du vieillissement (Gagnon et al., 2015; Joël Lefebvre, 2014). La tomographie par cohérence optique Doppler permet de cartographier les vitesses de débit sanguin; (Sakadžić et al., 2014; Srinivasan et al., 2011) ont développé une technique pour mesurer la distribution de la concentration en oxygène dans les tissus.

Un désavantage de ces techniques optiques est qu'elles sont limitées à la surface du cerveau étant donné la faible profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus diffusants. Elles ne permettent pas d'obtenir une vue d'ensemble du réseau neurovasculaire ou de la matière blanche pour tout le cerveau, ce qui peut limiter la portée des conclusions des études en neurophysiologie. Si on restreint l'étude du cerveau à ses aspects anatomiques et morphologiques, on peut effectuer de l'imagerie *ex vivo* optique avec un système d'histologie massive (Kleinfeld et al., 2011; Ragan et al., 2012). Un tel système utilise un vibratome pour couper de fines tranches de tissus en cours d'acquisition, un support à échantillon motorisé pour déplacer l'échantillon et permettre au microscope optique d'acquérir plusieurs images par tranches à une résolution micrométrique. Ce système capte des milliers d'images qui doivent ensuite être coregistrées et recollées ensemble pour obtenir une vue complète de l'organe mesuré. Selon la modalité optique et le protocole expérimental utilisé, il est alors possible d'observer différentes caractéristiques des tissus comme les vaisseaux sanguins (Mayerich et al., 2008), la composition chimique par microscopie Raman (Bégin et al., 2014; Y. Fu et al., 2008), l'expression de certaines protéines et de certains gènes (A. R. Jones et al., 2009; Lein et al., 2007), la microstructure des tissus par microscopie photo-acoustique (Wong et al., 2017), ou bien l'orientation locale des fibres par tomographie en cohérence optique sensible à la polarisation (PS-OCT) (H. Wang, Zhu, & Akkin, 2014). Pour illustrer, le projet (Oh et al., 2014b) vise à cartographier l'ensemble des neurones et des vaisseaux sanguins pour un cerveau de souris (Figure 1.1). Le parcours des neurones est imagé en injectant un marqueur fluorescent viral antérograde. En tranchant les cerveaux, et en imageant la fluorescence associée au virus injecté, la projection des neurones du lieu d'injection jusqu'aux aires corticales auxquelles elles sont connectées est retrouvée. En modifiant les lieux d'injection, les

marqueurs fluorescents, et en répétant l'expérience pour plusieurs animaux, ce projet a produit un atlas de la connectivité pour la souris.

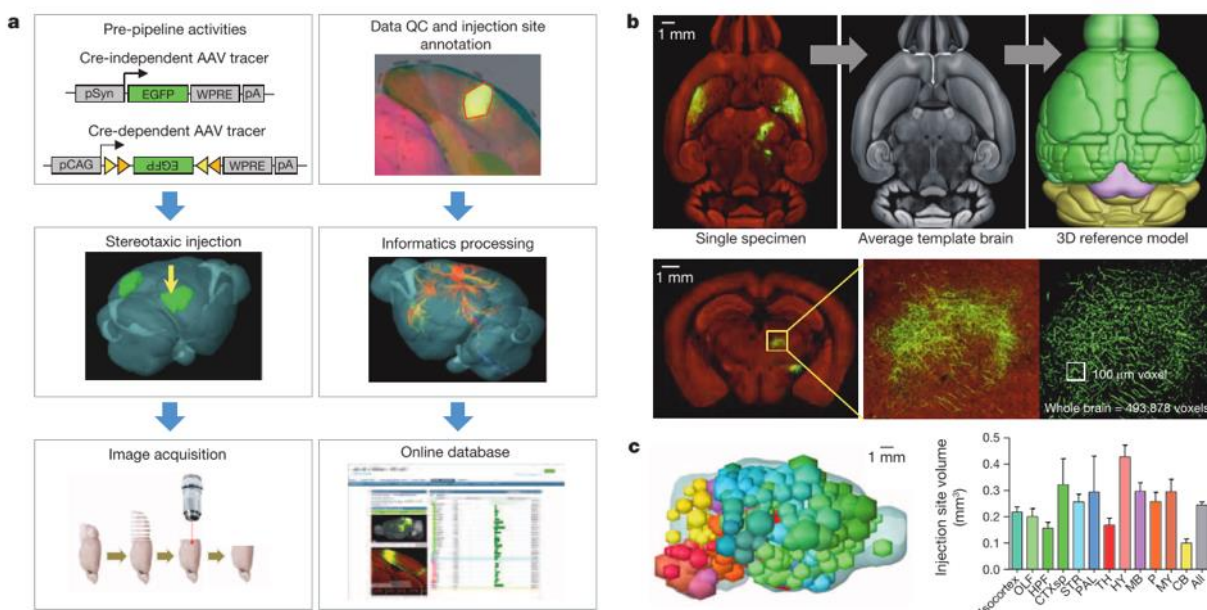


Figure 1.1 Aperçu du pipeline d'un pipeline d'imagerie développé par le Allen Brain Institute pour cartographier le connectome au sein d'un cerveau de souris entier. Reproduction de la figure 1 de (Oh et al., 2014b)

### 1.1.2 Validation de l'IRM de diffusion

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie développée durant les années 70. Elle est répandue en imagerie biomédicale pour sa grande résolution, ses capacités de distinction des types de tissus et pour son caractère non ionisant. En neurosciences, une technique IRM populaire est l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) (A. L. Alexander et al., 2007). En appliquant des gradients magnétiques orientés selon 6 directions (et leurs inverses pour une séquence d'acquisition de type spin écho), la diffusion de l'eau dans les tissus est encouragée le long de ces directions. Dans les tissus isotropes, la diffusion est de même amplitude, peu importe l'orientation d'application des gradients. Toutefois, dans les fibres de matière blanche la diffusion sera favorisée axialement le long des axones en comparaison à la diffusion radiale qui rencontre plusieurs membranes cellulaires et gaines de myéline. Ainsi, en caractérisant le tenseur de diffusion, il est possible d'estimer la présence et l'orientation des fibres dans le cerveau. Plusieurs métriques sont calculées à partir du modèle DTI, dont l'anisotropie fractionnelle (FA), les diffusivités moyenne (MD), radiale (RD) et axiale (AD) ainsi que l'orientation des fibres. Cette

technique peut entre autres être utilisée pour étudier le vieillissement du cerveau (Moseley, 2002), les blessures de la moelle épinière (Clark & Werring, 2002) et l'effet des accidents vasculaires cérébraux ischémiques (Sotak, 2002). Lorsqu'elle est combinée à des algorithmes adéquats, il est possible d'extraire à partir de ces données IRM le parcours des fibres de matière blanche dans le cerveau (Derek K Jones, 2010), et donc d'obtenir un connectome structurel du cerveau.

Le DTI à 6 directions actuellement utilisé est toutefois peu robuste face à certaines configurations de fibres, par exemple lorsque plusieurs fibres se croisent dans un même voxel ou lorsqu'elles s'étendent spatialement (Jacques-Donald Tournier et al., 2011). Ces limitations réduisent la résolution angulaire des tenseurs de diffusion, introduisent des erreurs de cartographie des streamlines et une mauvaise représentation des connexions entre les zones corticales. Des techniques plus poussées ont donc été développées afin d'obtenir une meilleure résolution angulaire sur la diffusion, et un formalisme mathématique plus complexe est nécessaire pour déterminer l'orientation des fibres et leur parcours (Descoteaux, 2008). Par exemple, les séquences d'acquisition HARDI multi-couches (Caruyer et al., 2013) sondent chaque position d'un volume à une multitude d'angles et pour plusieurs valeurs de gradients afin de décrire la diffusion à l'aide d'un tenseur d'ordre supérieur (Descoteaux, 2015). Ces nouvelles séquences d'acquisition doivent être accompagnées de modèles plus poussés pour décrire le signal, telles que la fonction de distribution d'orientations (ODF). De plus, les algorithmes de tractographie peuvent être affinés pour pallier la résolution angulaire limitée des mesures, par exemple en effectuant une déconvolution sphérique des ODF pour obtenir une estimation de l'orientation des fibres (fODF) (Descoteaux et al., 2009), en utilisant des algorithmes de tractographie probabilistes (Descoteaux et al., 2009), ou en mesurant le tractogramme global plutôt que de calculer plusieurs streamlines (Kreher et al., 2008). L'information supplémentaire fournie par les séquences HARDI et les fODF peut être exploitée pour estimer le nombre d'orientations de fibres dans un voxel (Dell'Acqua & Catani, 2012) et la densité apparente des amas de matière blanche (Raffelt et al., 2012). D'autres modèles exploitent l'information sur la diffusion provenant de plusieurs compartiments du tissu pour évaluer des métriques liées à la dispersion des orientations, aux diamètres des axones, et à la fraction volumique de l'eau contenue dans les axones versus l'eau contenue dans les tissus environnants (D. C. Alexander et al., 2010; Daducci et al., 2015; Zhang et al., 2012).

La multiplicité des modèles pour analyser l'IRM de diffusion requiert de valider les hypothèses posées par ceux-ci sur la microstructure du tissu. De nombreuses études de validation par microscopie optique des mesures IRM ont été réalisées au fil des années. (Jespersen et al., 2010) ont validé une mesure de la densité de neurite (axone, dendrite) dans des tranches de cerveaux de rats à l'aide de l'histologie conventionnelle et de la microscopie électronique. Également pour des tranches de cerveaux de rats qui ont été marquées pour révéler la myéline, (Leergaard et al., 2010) ont comparé les orientations de fibres extraites par histologie et par une séquence d'imagerie par diffusion. Les orientations des fibres ont été estimées manuellement dans quelques régions d'intérêt choisies aléatoirement dans les tissus. (Budde & Frank, 2012; Choe et al., 2012) ont quant à eux remplacé l'estimation manuelle par une méthode de traitement d'images qui extrait l'orientation principale de la texture dans l'image histologique. Leur calcul des orientations des fibres à partir de fines tranches histologiques est limité à des directions 2D. Pour mesurer des orientations 3D des fibres dans les tissus, (H. Wang, Zhu, Reuter, et al., 2014) ont utilisé un microscope OCT, (Khan et al., 2015; K. Schilling et al., 2016; K. G. Schilling et al., 2017) ont employé un microscope confocal, et (Salo et al., 2018) ont utilisé un microscope électronique. Toutes ces méthodes sont toutefois restreintes à imager les fibres dans des sections limitées du tissu. Les mesures IRMd sont faites avec des tranches de cerveaux, ou bien dans de petites régions 3D lorsque le microscope est couplé à un système d'histologie sérielle. Un système d'histologie sérielle permettant d'imager à grande résolution la matière blanche dans des cerveaux entiers et dont les images peuvent être comparées aux images IRMd acquises sur les mêmes cerveaux est donc un outil qui serait très utile pour les études de validation IRMd. De plus, un tel système pourrait être utilisé pour compléter les résultats trouvés lors d'études de groupes animales employant l'IRMd. Cette thèse s'inscrit dans ce but. La modalité optique utilisée pour la plateforme d'histologie est la tomographie en cohérence optique (OCT), puisqu'il a été montré qu'elle possède un grand contraste dans la myéline et qu'elle est aussi sensible à la présence des corps cellulaires (Leahy et al., 2013).

## 1.2 Objectifs de recherche

L'histologie sérielle génère des milliers d'images volumétriques pour un cerveau de souris. Ces mesures peuvent même occuper un espace disque au-delà de 1 TO pour les acquisitions avec un objectif 10X. L'utilisation de cette technique d'imagerie lors d'études de groupe nécessite donc une méthode de reconstruction automatisée et pouvant être intégrée aux technologies de neuro-



imagerie déjà utilisées pour ces études animales, telle que l'IRM de diffusion. L'objectif principal de ce projet de recherche doctoral était donc de développer les techniques d'analyse d'images nécessaires à la reconstruction 3D des données acquises par histologie sérielle en OCT. Ces pipelines d'acquisition et d'analyse devaient pouvoir être utilisés pour des études de validation de l'IRM de diffusion ainsi que pour des études de groupes multimodales employant des cerveaux de souris. Cet objectif principal se décline en 3 objectifs spécifiques de recherche.

### **1.2.1 Objectif 1**

Le premier objectif du projet de recherche est de développer une technique de traitement d'images pour assembler les mesures SOCT en un seul volume. En plus de la coregistration des données et de la fusion des images, les méthodes développées dans le cadre de cet objectif ont été utilisées pour corriger les artefacts d'imagerie, pour segmenter les tissus, pour créer des cerveaux moyens et aligner entre elles les données issues de plusieurs modalités. Cet objectif nécessite également la mise en place de serveurs de stockage pour conserver les multiples téraoctets de données générées par l'histologie sérielle, de même que l'installation d'un serveur de calcul dédié à la reconstruction des volumes. Les méthodes développées pour cet objectif ont mené à la publication de l'article suivant, présenté au Chapitre 4.

Lefebvre, Joël, Alexandre Castonguay, Philippe Pouliot, Maxime Descoteaux, Frédéric Lesage. (2017) « Whole mouse brain imaging using optical coherence tomography: reconstruction, normalization, segmentation, and comparison with diffusion MRI », *Neurophotonics* 4(4), 41501, International Society for Optics and Photonics [doi:10.1117/1.NPh.4.4.041501].

### **1.2.2 Objectif 2**

Lors de la conception d'un système d'histologie massive, un compromis doit être inévitablement fait entre la résolution des images et la taille des jeux de données générées par les mesures. Un OCT sériel utilisant uniquement un objectif à faible grossissement permet d'acquérir un cerveau de souris entier en peu de temps et les jeux de données générés ont des tailles réduites, ce qui facilite leur assemblage. Toutefois, une faible résolution signifie également une réduction des détails visibles dans les tissus. Par exemple, l'imagerie individuelle des composants cellulaires tels que la myéline nécessite un plus grand grossissement, ce qui rendrait les mesures d'histologie

sérielle excessivement longues et présenterait un défi de taille pour la reconstruction des données. Un système ayant la possibilité d’imager un cerveau entier à faible grossissement et de cibler un nombre limité de régions d’intérêt à observer à grand grossissement est donc une solution possible à ce dilemme d’histologie massive. Le second objectif est de concevoir un tel OCT sériel bi-résolution (2R-SOCT) qui pourra être utilisé pour la validation de l’IRM et pour les études de neuro-imagerie multimodales. Le système conçu pour cet objectif, ainsi que l’automatisation et l’analyse nécessaire à la mise en place de l’imagerie sérielle bi-résolution, est le sujet de l’article suivant qui est présenté au Chapitre 5.

Lefebvre, Joël, Patrick Delafontaine-Martel, Philippe Pouliot, Hélène Girouard, Maxime Descoteaux, Frédéric Lesage. (2018) « Fully automated dual-resolution serial OCT aimed at dMRI validation in whole mouse brains », soumis au journal *Neurophotonics* le 23 août 2018.

### **1.2.3 Objectif 3**

L’automatisation de l’histologie sérielle, le nouveau système d’imagerie bi-résolution et la mise en place d’un pipeline d’analyse multimodale offrent la possibilité d’étudier l’origine du signal OCT dans les tissus cérébraux et d’utiliser la microscopie sérielle pour compléter les mesures d’IRM de diffusion lors d’études de neuro-imagerie de cerveaux de souris. Le troisième objectif est donc d’évaluer la corrélation entre OCT et dMRI. Cet objectif a été abordé dans les deux articles présentés aux chapitres Chapitre 4 et Chapitre 5. C’est également le sujet principal d’une étude en cours (juillet 2018), pour laquelle un article sera soumis au cours du mois suivant le dépôt de cette thèse.

## **1.3 Contributions**

Le développement d’un nouveau système d’imagerie telle que l’histologie sérielle par OCT ne peut être qu’un projet multidisciplinaire nécessitant la contribution de plusieurs étudiants, chercheurs, techniciens et groupes de recherche ; d’autant plus que l’objectif principal de cette thèse est de combiner les données provenant de deux modalités d’imagerie (dMRI et SOCT) en un pipeline d’analyse multimodale et multirésolution des cerveaux de petits animaux. L’acquisition et l’analyse des données d’IRM de diffusion n’auraient pas été possibles sans l’aide précieuse de Philippe Pouliot (Polytechnique Montréal) et du prof Maxime Descoteaux (Université de

Sherbrooke). Quant à l'imagerie sérielle, une première itération du système et de la reconstruction des données a été mise en place par Alexandre Castonguay (Thèse : Histologie massive basée sur [l'OCT] (Castonguay, 2017)) et par Pr. Frédéric Lesage, mon directeur de thèse. Plusieurs autres étudiants se sont ensuite joints au projet, dont Pier-Luc Tardif (Mémoire : Validation de l'imagerie intravasculaire par [SOCT] et microscopie confocale en fluorescence (P.-L. Tardif, 2018)) et Patrick Delafontaine-Martel (Mémoire : Histologie sérielle [par microscopie 2-photons] afin d'étudier les changements de microvasculature dans la maladie d'Alzheimer (Delafontaine-Martel, 2018)). Le projet de recherche présenté dans cette thèse est donc redevable de leur contribution. Néanmoins, cette thèse présente plusieurs contributions originales qui ont mené soit à des publications d'articles, à des communications de conférences ou de séminaires, à des outils méthodologiques et à des infrastructures de recherche essentielles à la poursuite d'études d'histologie sérielle. Les contributions originales de ce projet sont :

- Méthode de reconstruction des données d'histologie sérielle en un seul volume.
- Développement d'un algorithme de compensation de l'atténuation du signal avec la profondeur pour les tranches de tissus acquises par OCT.
- Développement d'un nouveau système d'histologie sérielle basée sur le SOCT développé par Alexandre Castonguay. Le nouveau système d'OCT sérielle bi-résolution (2R-SOCT), combine un OCT (3X) et un OCM (40X) et permet de réaliser des mesures entièrement automatisées de cerveaux de souris, en plus de sélectionner et d'imager des régions d'intérêts avec l'OCM.
- Développement et optimisation d'un module Python pour l'acquisition et l'automatisation de l'histologie sérielle.
- Pipeline de registration multimodale et multirésolution permettant de réaliser des études de validation multimodale et des études animales de groupes basées sur l'histologie sérielle.
- Étude de l'origine du contraste OCT dans le cerveau.

Finalement, voici les livrables et communications scientifiques résultant de cette thèse. Outre les articles présentés dans les prochains chapitres, les méthodes de reconstruction des données d'histologie sérielle ont aussi été utilisées avec d'autres modalités optiques (Microscopie 2-photons, microscopie confocale en fluorescence) et avec d'autres types de tissus que les cerveaux de souris (Aortes de lapin (Pier-Luc Tardif), cœur de souris (Alexandre Constonguay)).

### 1.3.1 Articles de journaux

1. **Lefebvre, J.**, Delafontaine-Martel, P., Pouliot, P., Descoteaux, M., Lesage, F. (2018) Fully automated dual-resolution serial OCT aimed at dMRI validation in whole mouse brains. Soumis au journal *Neurophotonics* le 23 août 2018.
2. **Lefebvre, J.**, Pouliot, P., Descoteaux, M., Girouard, H., Lesage, F., (en rédaction). Investigation of the effect of arterial pulsatility variations on white matter in whole mouse brains using serial histology and diffusion MRI. Soumission de cette lettre à la fin du mois d'août 2018.
3. Delafontaine-Martel, P., **Lefebvre, J.**, Tardif, P.L., Levy, B., Pouliot, P. & Lesage F. (2018). Whole brain vascular imaging in a mouse model of Alzheimer's disease with two-photon microscopy. *Journal of biomedical optics*, Accepted for publication on June 21, 2018.
4. Castonguay, A., **Lefebvre, J.**, Pouliot, P., & Lesage, F. (2018). Comparing three-dimensional serial optical coherence tomography histology to MRI imaging in the entire mouse brain. *Journal of biomedical optics*, 23(1), p.016008.
5. Castonguay, A., **Lefebvre, J.**, Pouliot, P., Avti, P., Moeini, M., & Lesage, F. (2017). Serial optical coherence scanning reveals an association between cardiac function and the heart architecture in the aging rodent heart. *Biomedical optics express*, 8(11), 5027–5038.
6. **Lefebvre, J.**, Castonguay, A., Pouliot, P., Descoteaux, M., & Lesage, F. (2017). Whole mouse brain imaging using optical coherence tomography: reconstruction, normalization, segmentation, and comparison with diffusion MRI. *Neurophotonics*, 4(4), p.041501.
7. Tardif, P. L., Bertrand, M. J., Abran, M., Castonguay, A., **Lefebvre, J.**, Stähli, B. E., Merlet, N, Mihalache-Avram, T., Geoffroy, P., Mecteau, M, Busseuil, D, Ni, F, Abulrob, A, Rhéaume, É, L'Allier, P, Tardif, J, Lesage, F. (2016). Validating Intravascular Imaging with Serial Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Microscopy. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2110.

### 1.3.2 Conférences et séminaires<sup>1</sup>

1. **Lefebvre, J.\***, Castonguay, A. & Lesage F. (2018, Janvier). Imaging whole mouse brains with a dual resolution serial swept-source optical coherence tomography scanner. *Neural Imaging and Sensing*. SPIE Photonics West BIOS, San Francisco, United States (Vol. 10481, pp.104810I) (Oral)
2. Castonguay, A., **Lefebvre, J.\***, Lesage, F. (2018, Février). Serial OCT reveals age-dependent cardiac fiber orientation change. *Diagnostic and Therapeutic Applications of Light in Cardiology 2018*, SPIE Photonics West BIOS, San Francisco, United States (Oral)
3. Delafontaine-Martel, P.\* , **Lefebvre, J.**, Damseh, R., Castonguay, A., Tardif, P., & Lesage, F. (2018, Février). Large scale serial two-photon microscopy to investigate local vascular changes in whole rodent brain models of Alzheimer's disease. In *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVIII* (Vol. 10498, p.104982O). International Society for Optics and Photonics. (Affiche)
4. **Lefebvre, J.\***, Delafontaine-Martel, P.\*, Castonguay, A., Lesage, F. (2017). Automated Serial Blockface Histology: Acquisition, Reconstruction and Applications. *MNI-BigBrain Workshop 2017*, McGill Neurological Institute, Montréal, Canada (Affiche)
5. **Lefebvre, J.\*** Castonguay, A., & Lesage, F. (2017, Février). White matter segmentation by estimating tissue optical attenuation from volumetric OCT massive histology of whole rodent brains. *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXIV*, SPIE Photonics West BIOS, San Francisco, United States. (Oral)
6. Castonguay, A.\*, **Lefebvre, J.**, Tardir P.L., Delafontaine-Martel, P., Pouliot, P., Lesage, F. (2016, Novembre). Serial OCT scanner: comparing 3D histology to In vivo imaging in the entire mouse brain. Society for Neuroscience, 2016. No. 559.04, pp. 1743–1744 (Affiche)
7. Castonguay, A., Delafontaine-Martel, P., **Lefebvre, J.**, Tardif, PL\* (2016) Développement d'un système d'histologie massive multimodale pour l'imagerie ex-vivo. *1er forum Franco-Québécois d'Innovation en Santé*, Montréal, Canada (Affiche)
8. **Lefebvre, J.\***, Castonguay, A., Lesage, F. (2016). Three-dimensional En-Face OCT massive histology of rat brains: Reconstruction and Optical Attenuation Estimation.

---

<sup>1</sup> \* désigne le(s) présentateur(s) pour la conférence ou le séminaire.

*RBIQ/QBIN Workshop: Toward a super-big brain*, Réseau de bio-informatique du Québec, Montréal, Canada (Affiche)

9. Lesage, F.\*, Castonguay, A., Tardif, P. L., **Lefebvre, J.**, & Li, B. (2015, Septembre). Investigating the impact of blood pressure increase to the brain using high resolution serial histology and image processing. In SPIE Optical Engineering + Applications(pp. 95970M-95970M). International Society for Optics and Photonics (Présentation orale)

### 1.3.3 Outils méthodologiques et données

- Système d'histologie sérielle par OCT bi-résolution (2R-SOCT)
- **slicercode** : Module Python utilisé pour la reconstruction des données d'histologie massive
- **pyoct** : Module python utilisé pour l'acquisition SOCT, l'acquisition, la reconstruction et l'analyse des données 2R-SOCT, ainsi que la reconstruction des données OCT et OCM
- **dmri\_analysis** : Code python pour la reconstruction et l'analyse des données dMRI
- **slicergalaxy** : Code pour le serveur de reconstruction Galaxy, et les serveurs docker/galaxy
- **Article A1 Analysis** : Code d'analyse et de registration utilisé pour l'article 1.
- **OCT Mouse Brain Template** : Cerveau de souris moyen (Réflectivité et Atténuation) obtenu en normalisant 10 cerveaux SOCT acquis pour l'étude de déformation. La version 50microns est publié sur MendeleyData (Joël Lefebvre, Castonguay, & Lesage, 2017a) et la version 25microns est disponible sur nos serveurs internes.

### 1.3.4 Infrastructures de recherche

- 2 serveurs FTP (129TB chacun en RAID6) pour le stockage des données d'histologie.
- Serveurs de calcul (Jupyter & Galaxy) pour la reconstruction des données
- Serveur virtuel Docker/Galaxy pour la reconstruction des données

### 1.3.5 Autres

- Couverture du journal *Neurophotonics* (Vol.4, No.4, Octobre-Décembre 2017)
- Matériel promotionnel utilisé lors de la conférence *SPIE Photonics West 2018* et pour les appels à communications des journaux *Neurophotonics*, et *Journal of Biomedical Optics*.

## CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Cette revue critique de la littérature aborde dans un premier temps les méthodes d'imageries spécifiques à la myéline. La tomographie par cohérence optique est la modalité d'imagerie utilisée pour ce projet de recherche et est abordée en détail. La revue de littérature se termine par une présentation de l'origine du contraste OCT dans les tissus, et discute des modèles d'interaction lumière/tissu à un ou plusieurs événements de diffusion.

### 2.1 Imagerie optique de la myéline

La méthode d'imagerie qui a longtemps été la référence absolue (*gold standard*) pour étudier la myéline et valider les techniques d'imagerie de ce composant cellulaire est l'histologie par microscopie électronique (Wouterlood, 2012). Cette technique d'imagerie a permis d'identifier l'ultrastructure des couches de myéline, leurs compositions moléculaires, ainsi que leur mécanisme de formation pendant leur développement et leur dégradation suite à certaines pathologies (Hildebrand et al., 1993). La microscopie électronique a été utilisée pour valider plusieurs mesures IRM caractérisant la myéline, comme le DTI (Salo et al., 2018), le g-ratio (Stikov et al., 2015) ou la densité de neurite (Jespersen et al., 2010). Un avantage de cette dernière technique est la grande résolution obtenue due à l'utilisation des électrons. La microscopie électronique est toutefois une modalité coûteuse et qui nécessite une préparation des tissus biologiques pour les fixer et pour augmenter leur contraste. De plus, la profondeur de pénétration des électrons dans la matière est très limitée, ce qui a traditionnellement circonscrit les images microélectroniques à la surface des échantillons ou encore cette technologie nécessitait un traitement pour rendre les tranches imagées ultraminces. De nouvelles techniques permettent d'imager les tissus en 3 dimensions. Par exemple, lorsque la microscopie électronique est combinée à un faisceau d'ions focalisé (FIB), il est possible d'automatiser l'acquisition de plusieurs tranches de tissu en parallèle à une résolution nanométrique, puis de graver avec le faisceau FIB une mince couche de matière à la surface de ces échantillons pour obtenir une série d'images à plusieurs profondeurs (Hayworth et al., 2015). Il est également possible d'utiliser un ultra-microtome à l'intérieur de la chambre d'imagerie du microscope pour couper de fines couches de tissu de façon automatique durant l'acquisition (Kremer et al., 2015). En dépit de ces avancées, des progrès en imageries tridimensionnelles et de la résolution nanométrique atteinte par ces nouveaux microscopes, le prétraitement des tissus demeure difficile à mettre en œuvre, long, et potentiellement dommageable.

Une autre technique fréquemment employée est l'histologie optique. Elle se sert de différents marqueurs et colorants pour augmenter le contraste optique spécifique de certaines molécules et structures cellulaires dans de minces tranches de cerveau (JoVE, 2018). Certains marqueurs en histologie du cerveau sont :

- Le Luxol Fast Blue (LFB) qui se fixe aux lipides formant les couches de myéline et qui peut être utilisé en même temps que le Cresyl violet (parfois nommé *Nissl Staining*) pour observer les corps cellulaires (Klüver & Barrera, 1953). Cette technique de marquage Nissl a d'ailleurs été utilisée pour la première version de l'atlas de souris du Allen Institute disponible en ligne (Lein et al., 2007).
- Il est également possible d'utiliser la méthode d'hybridation *in situ* pour cartographier l'expression des gènes dans un cerveau de souris (Allen Institute, 2011).
- L'immunohistologie utilise des antigènes fonctionnalisés avec des groupes moléculaires fluorescents pour cibler des anticorps spécifiques à la surface des cellules. Ces marqueurs fluorescents peuvent être activés par l'activité enzymatique, par la proximité de certaines protéines, par la fixation à la surface des cellules, etc. (Alberts et al., 2013)
- Pour sa part, le projet BrainArchitecture utilise un colorant à base d'argent suivant la méthode de Gallyas pour cibler les couches de myéline (Uchihara, 2007).

(Mollink et al., 2017) ont utilisé l'histologie conventionnelle et l'imagerie par lumière polarisée pour évaluer la dispersion de l'orientation des fibres de matière blanche dans des tissus humains fixés. Leurs mesures ont été comparées à l'IRMd dans trois régions et elles ont révélé une corrélation entre les mesures optiques et IRM. La limitation principale de l'histologie optique conventionnelle est la longue préparation des tranches de tissus nécessaire pour cibler des composants cellulaires spécifiques. Ces tranches minces (entre 5  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$ ) nécessitent plusieurs étapes de traitement chimique pour fixer les tissus et rehausser le contraste, chacune pouvant introduire des dommages. De plus, les images acquises sont en 2 dimensions, ce qui rend ardue l'extrapolation de certaines mesures en 3D (p. ex. orientation des fibres).

Pour éviter les limitations de l'histologie conventionnelle, il est donc intéressant d'utiliser d'autres modalités optiques pour lesquelles la myéline possède un contraste intrinsèque et qui offrent un sectionnement optique axial. Une telle modalité d'imagerie est la tomographie par cohérence optique (OCT). (Leahy et al., 2013) ont montré que c'est majoritairement la myéline qui contribue au contraste lorsque l'OCT est utilisé pour imager une tranche de cerveau. (Srinivasan et al., 2012)



ont également fait la démonstration que l'OCT permet de mesurer *in vivo* l'indice de réfraction, le coefficient de diffusion, l'angiographie et des marqueurs intrinsèques de la viabilité cellulaire à partir du contraste intrinsèque. (Ben Arous et al., 2011) ont mesuré les fibres de myéline individuelle *in vivo* grâce à la microscopie par cohérence optique (OCM). Leurs expériences, réalisées sur des rats ayant subi une craniectomie, ont permis de cartographier la densité de myéline dans le cortex. Ils ont également proposé qu'en mesurant le contraste des franges d'interférence au sein des amas de fibre, il serait possible d'estimer l'inclinaison de l'amas par rapport à l'axe optique du microscope. (Magnain et al., 2014) ont fait la démonstration que l'OCT contient des informations équivalentes au marquage Nissl pour des tranches de cortex humain. En utilisant un système d'histologie massive avec un microscope OCT sensible à la polarisation de la lumière (PS-OCT) ou OCT multi-contraste (MC-OCT), (H. Wang et al., 2016) ont mesuré une carte de la réflectivité, de la retardance et de l'atténuation optique pour plusieurs tranches d'un cerveau de souris à une résolution micrométrique. En analysant ces contrastes, il est alors possible d'obtenir une carte de l'orientation locale 3D pour l'ensemble du cerveau. Les streamlines obtenues par tractographie 3D à partir de ces données optiques sont similaires à celles mesurées en IRM de diffusion (H. Wang et al., 2015; H. Wang, Zhu, Reuter, et al., 2014).

Outre l'OCT, il est également possible d'imager la myéline à l'aide d'un microscope confocal ou d'un microscope 2-photon. Par exemple, en utilisant un montage d'histologie massive, un microscope confocal à fluorescence et une analyse des tenseurs de structure, (Budde & Frank, 2012) ont extrait la distribution des orientations de fibres à partir de tranches de cerveau *ex vivo*. Selon eux, il est possible d'observer la microstructure de la myéline à l'échelle microscopique pour l'ensemble d'un organe, de plus les mesures d'anisotropies mesurées par microscopie optique sont fortement corrélées à celles mesurées par des techniques d'IRM de diffusion. De leur côté, (Ragan et al., 2012) ont combiné un microscope 2-photon et un trancheur automatisé pour cartographier la fluorescence en 3D pour des cerveaux de souris transgéniques exprimant du GFP. Ils ont aussi injecté des traceurs fluorescents pour mesurer le parcours de fibres neuronales. Les deux techniques présentées ici requièrent l'ajout d'agents de contraste pour cibler les neurones. L'avantage principal de la microscopie 2-photon est sa plus grande profondeur de pénétration dans les tissus diffusants, puisqu'elle utilise une plus grande longueur d'onde d'excitation (Helmchen & Denk, 2005). Il est tout de même possible d'utiliser la microscopie confocale sans agent de contraste. Par exemple, (Schain et al., 2014) ont utilisé une nouvelle technique de microscopie confocale en réflectance

spectrale *in vivo* pour cartographier les fibres de myéline chez des souris sans nécessité de marqueurs. Ils ont montré que le signal de réflectance est sensible aux changements de microstructures des gaines de myéline, ce qui est un atout essentiel pour l'étude des neuropathologies affectant la matière blanche. Un avantage de leur microscope est la simplicité du système.

Une autre façon de mesurer le contenu en myéline à partir du contraste intrinsèque des tissus est à l'aide d'un microscope à effet Raman stimulé (Bégin et al., 2014; D. Fu et al., 2013). Cependant ce phénomène optique non linéaire possède un très faible contraste. (N.P. Kutuzov et al., 2015; Nikolay P. Kutuzov et al., 2014) ont montré que les gaines de myéline peuvent servir de guide d'onde pour la lumière. En évaluant l'efficacité du couplage entre une fibre optique et une gaine de myéline, et en mesurant le spectre Raman des fibres de matières blanches, ils ont été en mesure de distinguer des régions de myéline selon leur organisation structurelle.

## **2.2 Tomographie en cohérence optique (OCT)**

La tomographie en cohérence optique (en anglais *Optical Coherence Tomography* ou OCT) est une technique d'imagerie optique développée au début des années 1990 (Huang et al., 1991) . Elle exploite le phénomène d'interférence entre la lumière afin d'imager de façon non invasive et en trois dimensions des échantillons biologiques. Depuis, l'OCT a été utilisé dans une variété de domaines, dont l'ophtalmologie, la cardiologie, la médecine nucléaire, la biochimie, la chirurgie assistée ou encore en neuroscience (Drexler & Fujimoto, 2015). Cette modalité d'imagerie connaît un intérêt exponentiel, comme le témoigne la quantité phénoménale d'articles recensés à ce jour (Juillet 2018) sur le site *Web of Science* utilisant le mot clé OCT (Figure 2.1).

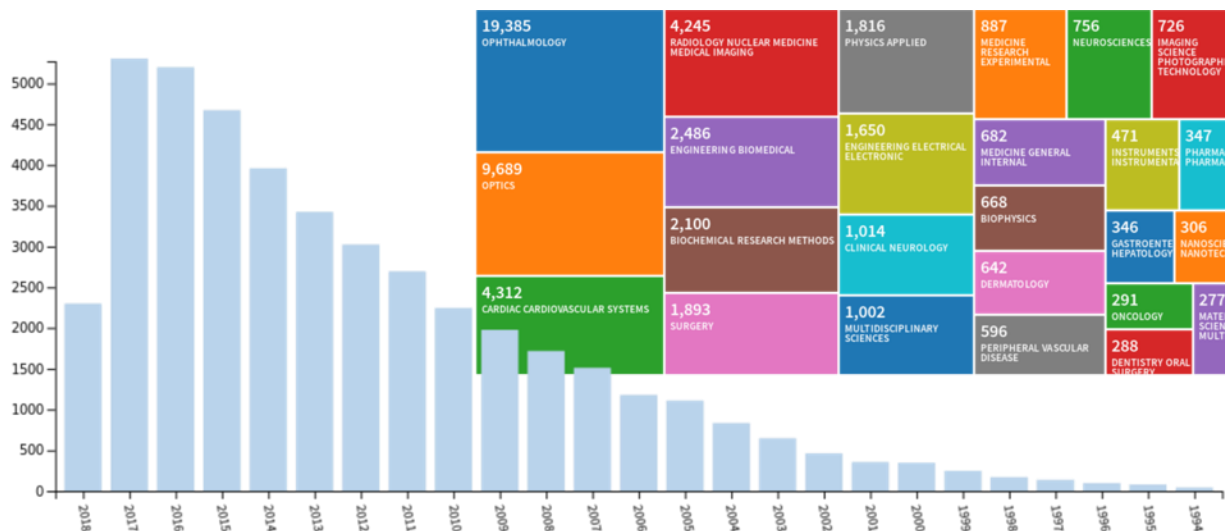


Figure 2.1 Nombre de publications par année mentionnant le mot clé “OCT » et principaux domaines d’application de cette modalité. Données et images issues du site web « WebOfScience » (Reuters, 2012).

### 2.2.1 Théorie de l’OCT

Cette section présente sous forme abrégée la théorie unifiée de l’OCT publiée dans le récent ouvrage *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications* (Drexler & Fujimoto, 2015). La Figure 2.2 représente de façon schématique un OCT basé sur un interféromètre de Michelson. L’interféromètre est illuminé par une onde plane polychromatique incidente de faible longueur de cohérence. Un séparateur de faisceau dirige ensuite la lumière vers un bras de référence et un bras échantillon. Dans le bras de référence, un miroir est positionné à une distance  $z_R$  du séparateur de faisceau et est caractérisé par une réflectivité  $r_R$ . L’échantillon est quant à lui considéré comme étant formé d’une multitude d’interfaces de réflectivité  $(r_{S1}, r_{S2}, \dots, r_{SN})$  qui sont positionnés à une distance  $(Z_{S1}, Z_{S2}, \dots, Z_{SN})$  du séparateur de faisceau. Les champs électriques réfléchis par le miroir de référence et les interfaces rencontrées dans l’échantillon sont combinés dans le séparateur de faisceau et l’interférence entre les champs est mesurée sous forme d’intensité lumineuse qui est par la suite convertie en photo-courant par un détecteur.

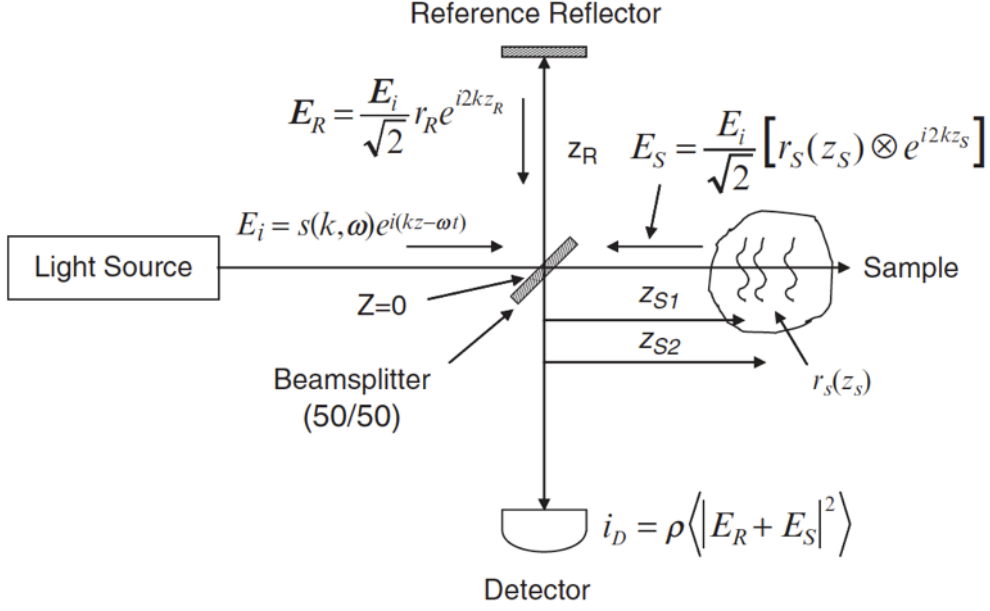


Figure 2.2: Représentation schématique d'un OCT basé sur un interféromètre de Michelson. Reproduction de la figure 2.3 de (Izatt et al., 2015).

Le but de l'OCT est de reconstruire le profil de réflectivité de l'échantillon à partir des mesures d'interférométrie non invasives. En utilisant la forme complexe des champs électriques présentés dans la Figure 2.2 et en développant le terme de l'intensité du photo-courant, on obtient l'interférogramme spectral :

$$\begin{aligned}
 I_D(k) = & \frac{\rho}{4} \left[ S(k) \left[ R_R + \sum_{n=1}^N R_{Sn} \right] \right] + \frac{\rho}{2} \left[ S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} (\cos[2k(z_R - z_{Sn})]) \right] \\
 & + \frac{\rho}{4} \left[ S(k) \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} (\cos[2k(z_{Sn} - z_{Sm})]) \right] \quad (2.1)
 \end{aligned}$$

où  $\rho$  est la responsivité du détecteur,  $k = 2\pi/\lambda$  est le nombre d'onde,  $R_n = |r_n|^2$  est la réflectance de l'interface  $n$ , et  $S(k)$  est la densité spectrale de la source. Le premier terme de la sommation dans l'équation 2.1 est la composante continue (DC) de l'interférogramme, le second terme est la corrélation croisée entre les champs électriques réfléchis par les interfaces rencontrées dans l'échantillon et le signal de référence, et le dernier terme est l'autocorrélation entre les réflecteurs de l'échantillon. Seul le terme de corrélation croisée est utilisé pour obtenir le signal OCT, les autres termes étant considérés comme des artefacts. La puissance relative des artefacts d'autocorrélation

par rapport au signal de corrélation croisée peut être ajustée à l'aide de la réflectivité du bras d'échantillon. Le terme continu peut quant à lui être éliminé en soustrayant un signal d'arrière-plan aux interférogrammes mesurés ou en utilisant un photodétecteur balancé.

Le signal OCT peut être mesuré de deux façons. La première façon est dans le domaine temporel (TD-OCT) pour laquelle tout le spectre d'interférence est mesuré simultanément avec un seul photodétecteur et la réflectivité de l'échantillon est estimée en balayant le miroir de référence sur plusieurs valeurs de  $z_R$ . En supposant que la source possède une densité spectrale de forme Gaussienne  $S(k) = \frac{1}{\Delta k \sqrt{\pi}} \exp \left[ -\left( \frac{k-k_0}{\Delta k} \right)^2 \right]$ , le signal mesuré par TD-OCT est alors obtenu en intégrant l'équation 2.1 pour tous les nombres d'ondes.

$$I_D(z_R) = \frac{\rho}{4} \left[ S_0 \left[ R_R - \sum_{n=1}^N R_{Sn} \right] \right] + \frac{\rho}{2} \left[ S_0 \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} e^{-[(z_R - z_{Sn})]^2 \Delta k^2} \cos[2k_0(z_R - z_{Sn})] \right] \quad (2.2)$$

où  $S_0$  est la puissance de la source,  $k_0$  est le nombre d'onde central de la source, et  $\Delta k$  est sa largeur de bande. Pour le TD-OCT, le profil de réflectivité de l'échantillon est modulé par un cosinus de fréquence porteuse. Cette fréquence est proportionnelle au nombre d'onde central de la source  $k_0$  et chaque réflecteur est convolué avec la fonction de cohérence de la source.

Le second type de détection est dans le domaine de Fourier (FD-OCT). Le miroir de référence est maintenu fixe et l'interférogramme spectral est mesuré soit en utilisant un laser à balayage et un seul détecteur (*Swept-source OCT*, SSOCT), soit en utilisant un laser à large bande et un spectromètre (*Spectral-domain OCT*, SDOCT). Le profil de réflectivité avec la profondeur de l'échantillon est obtenu en calculant la transformée de Fourier inverse de l'interférogramme spectral.

$$i_D(z) = \frac{\rho}{8} \left[ \gamma(z) \left[ R_R + \sum_{n=1}^N R_{Sn} \right] \right] + \frac{\rho}{4} \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} [\gamma[2(z_R - z_{Sn})] + \gamma[-2(z_R - z_{Sn})]] + \frac{\rho}{8} \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} [\gamma[2(z_{Sn} - z_{Sm})] + \gamma[-2(z_{Sn} - z_{Sm})]] \quad (2.3)$$

L'équation du photo-courant obtenue pour l'OCT dans le domaine de Fourier contient une composante continue (1<sup>er</sup> terme), une composante de corrélation croisée entre les réflecteurs et le miroir de référence (2<sup>e</sup> terme) et une composante d'autocorrélation (3<sup>e</sup> terme). Étant donnée la nature réelle du signal mesuré par le détecteur dans le mode d'opération spectral, l'interférogramme spectral est une fonction Hermitienne<sup>2</sup> de sorte que le profil de réflectivité calculé est symétrique par rapport à la position axiale du miroir de référence. Cet aspect des mesures FDOCT se nomme l'ambiguïté complexe. Il a pour conséquence qu'il est impossible de distinguer les réflecteurs se trouvant à des positions négatives de ceux se trouvant à des positions positives de même magnitude par rapport à la position du miroir de référence rapportée dans le bras d'échantillon. Une approche fréquente pour éviter les artefacts introduits par cette ambiguïté complexe est de positionner l'échantillon d'un seul côté du miroir de référence, ainsi tous les réflecteurs dans l'échantillon peuvent être résolus sans superposition au détriment d'une étendue axiale réduite d'un facteur 2. Plusieurs autres techniques existent pour corriger cette limitation, dont l'utilisation d'une fréquence porteuse (R. K. Wang, 2007; Wu et al., 2011), ou la résurgence de la cohérence (Bradu, Rivet, et al., 2016). Ces techniques peuvent être réunies sous le terme de *Complex-Conjugate Removal OCT* ou de *Full-range OCT*, puisqu'elles permettent d'utiliser l'étendue axiale complète de l'OCT. Un désavantage de ces dernières techniques est une augmentation de la complexité du système optique, des mesures plus lentes, une baisse de la sensibilité ou de nouvelles méthodes de reconstruction du signal telle que l'interférométrie OCT de type Maître/Esclave (Bradu, Jingyu, et al., 2016; Cernat et al., 2017).

Le terme  $\gamma(z)$  de l'équation du photo-courant pour le FDOCT est la fonction de cohérence de la source de lumière, définie comme étant la transformée de Fourier de la densité spectrale de la source  $S(k)$ . La largeur à mi-hauteur de la fonction de cohérence est définie comme étant la longueur de cohérence  $l_c$ . Pour une source de lumière de profil gaussien, la longueur de cohérence est liée à la largeur de bande de la source par

$$l_c = \delta z = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\Delta k} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (2.4)$$

---

<sup>2</sup> Pour une fonction Hermitienne,  $f^*(x) = f(-x)$  où \* désigne le complexe conjugué

où  $\lambda_0$  est la longueur d'onde centrale de la source et  $\Delta\lambda$  est sa largeur de bande. En vertu des équations obtenues pour le photo-courant des OCT temporel et spectral, les caractéristiques de la source définissent donc la résolution axiale  $\delta z$  du système d'imagerie. Plus la largeur de bande de la source sera grande, plus la résolution axiale des profils de réflectivité sera petite. Ce découplage entre la résolution latérale du microscope et la résolution axiale obtenue par la source de l'OCT est un des avantages principaux de cette modalité d'imagerie. Cela offre un degré de liberté supplémentaire utile lors de la conception d'un système d'imagerie. Également, l'opération d'un OCT en mode spectral permet d'obtenir tout le profil de réflectivité (A-Line) en une seule mesure du spectromètre ou un seul balayage en longueur d'onde d'une source variable, ce qui permet d'acquérir plus rapidement des volumes entiers à haute résolution. La propriété de la source de lumière définit l'étendue axiale des mesures. Par exemple pour un FD-OCT utilisant un spectromètre et une source gaussienne, la décroissance de la sensibilité avec la profondeur est (de Boer, 2015):

$$R(z) = \text{sinc}^2\left(\frac{\pi z}{2z_{max}}\right) \exp\left[-\frac{\pi^2 \omega^2}{8 \ln 2} \left(\frac{z}{z_{max}}\right)^2\right] \quad (2.5)$$

où  $z_{max}$  est la profondeur maximale de balayage de l'OCT et  $\omega$  est le ratio de la résolution spectrale sur l'intervalle spectral mesuré. La profondeur maximale de balayage pour l'OCT est liée à la taille d'échantillonnage du spectre  $\delta_s \lambda$  par le théorème de Nyquist

$$z_{max} = \frac{n_0 \lambda_0^2}{4 \delta_s \lambda} \quad (2.6)$$

$n_0$  l'indice de réfraction du tissu pour la longueur d'onde centrale.

Pour déterminer la résolution latérale  $\delta x$  d'un OCT, on peut considérer celui-ci comme étant un microscope confocal à balayage opéré en réflexion (Drexler & Fujimoto, 2015). Cette représentation est appropriée en particulier pour les OCT fibrés. En effet, à l'instar des sténopés utilisés en microscopie confocale les fibres optiques monomodes agissent comme des sténopés d'illumination et de collecte de la lumière. Ainsi, en considérant la théorie de la diffraction de la lumière et l'approximation de Fraunhofer, l'intensité du champ électromagnétique d'une onde plane traversant une lentille convergente de forme circulaire est décrite au plan focal par un patron de diffraction d'Airy (Boas et al., 2011) :

$$I(v) = \left[ \frac{2J_1(v)}{v} \right]^2 \quad (2.7)$$

où  $v = 2\pi x NA/\lambda_0$  est la coordonnée radiale normalisée,  $x$  est la distance radiale par rapport à l'axe optique,  $NA$  est l'ouverture numérique de la lentille,  $\lambda_0$  est la longueur d'onde centrale du système et  $J_1(v)$  est la fonction de Bessel de premier type d'ordre 1. Puisque l'illumination et la détection des photons rétrofléchis par l'échantillon sont réalisées avec la même optique, l'intensité détectée pour un réflecteur ponctuel est décrite latéralement par :

$$I_{PSF}(v) = \left[ \frac{2J_1(v_{ill})}{v_{ill}} \right]^2 \left[ \frac{2J_1(v_{dét})}{v_{dét}} \right]^2 = \left[ \frac{2J_1(v)}{v} \right]^4 \quad (2.8)$$

Cette équation décrit la fonction latérale d'étalement du point (PSF) pour un système d'imagerie de type confocal. En définissant la résolution latérale  $\delta x$  comme étant la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la PSF, on obtient

$$\delta_x = 0.37 \frac{\lambda_0}{NA} \quad (2.9)$$

### 2.2.2 Microscopie par cohérence optique (OCM)

L'OCT emploie généralement un objectif à faible ouverture numérique (NA) afin de tirer profit de la grande profondeur de champ offerte par cette optique. Cela permet d'imager un échantillon axialement sur une plus grande étendue avec une résolution latérale à peu près constante pour une A-line entière. L'OCT utilisant un objectif à faible NA permet d'acquérir des coupes transversales (*cross section*) d'un échantillon. Toutefois, les résolutions latérales obtenues avec un faible NA sont limitées, de sorte que les OCT ne peuvent pas être utilisés pour imager les cellules des tissus ou leurs composants. La microscopie par cohérence optique (OCM, (Aguirre et al., 2015)) utilise quant à elle des objectifs à grande ouverture numérique offrant une meilleure résolution latérale au détriment d'une profondeur de champ réduite (Figure 2.3). Par conséquent, l'OCM permet d'acquérir des coupes *en face* de l'échantillon plutôt que des coupes transversales comme l'OCT, et ces coupes sont acquises à une résolution latérale plus fine permettant de visualiser les composants cellulaires.



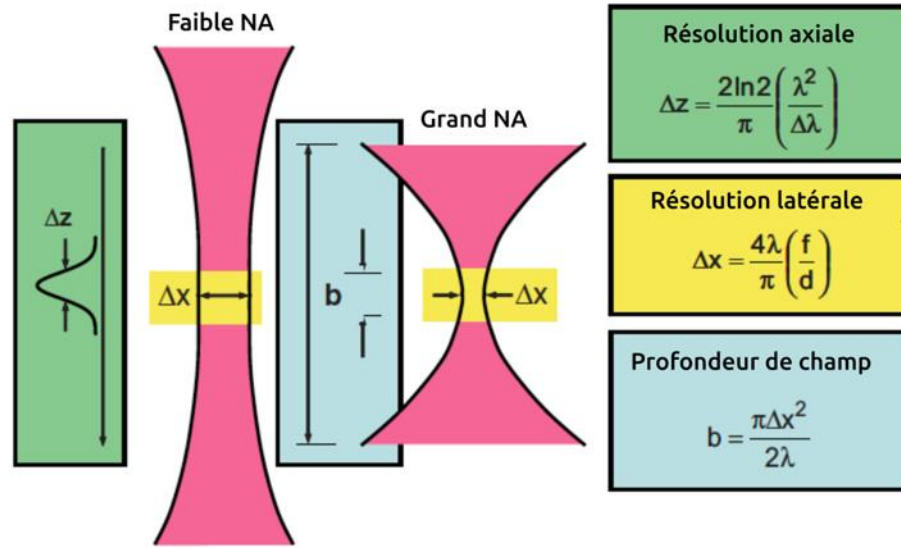


Figure 2.3 Limites de résolution de l'OCT pour un faible et un grand NA. Adapté de la figure 9.1 de (Drexler & Fujimoto, 2015)

La relation entre la résolution latérale  $w(z)$  et la profondeur de champ  $z_R$  d'un faisceau gaussien est (Träger, 2012).

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_R} \right)^2} \quad (2.10)$$

où  $z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} = \frac{w_0}{NA}$  est la longueur de Rayleigh (moitié de la profondeur de champ),  $w_0$  est la largeur minimale du faisceau gaussien et  $z$  est la position axiale le long du faisceau. Ainsi, plus la résolution latérale sera faible et plus la profondeur de champ du microscope sera réduite. Cette relation est illustrée à la Figure 2.4 pour un FD-OCT utilisant une source gaussienne ( $\lambda_0 = 1310nm$ ,  $\Delta\lambda = 100nm$ ). Au-dessus d'une valeur seuil de NA, la longueur de Rayleigh sera plus petite que la résolution axiale de l'OCT, ce qui fait du système un OCM.

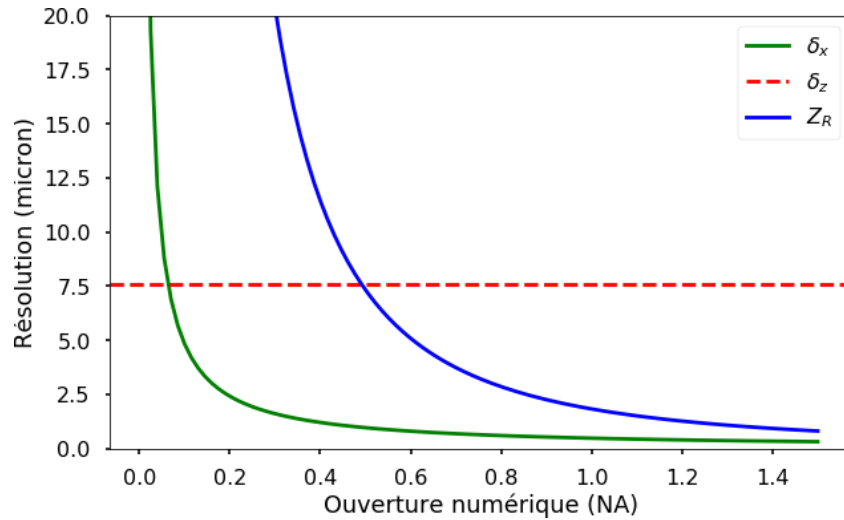


Figure 2.4 Résolutions caractéristiques d'un FD-OCT dans l'air ( $n=1$ ) en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif pour une source gaussienne ( $\lambda_0 = 1310\text{nm}$ ,  $\Delta\lambda = 100\text{nm}$ )

Plusieurs types d'OCT à grande ouverture numérique ont été développés ces dernières années, dont l'OCT à plein champ (FFOCT) (Dubois et al., 2002, 2004), l'holographie digitale (Kim, 2010), la microscopie par cohérence optique (OCM) (Huber et al., 2005), l'OCT par optique adaptative et l'interférométrie par ouverture synthétique (ISAM) (Ralston et al., 2007). Puisque la profondeur de champ est limitée avec ces systèmes, les mesures volumétriques doivent être obtenues en déplaçant mécaniquement le plan focal dans l'échantillon puis en assemblant les images acquises à plusieurs profondeurs. Ce type de mesures se nomme C-Mode OCT (Drexler et al., 1999; Huber et al., 2005). Une technique de reconstruction des mesures OCM (Reconstruction de Gabor) se contente de détecter le plan focal dans chaque image puis d'utiliser un masque centré autour de ces positions pour combiner les données provenant de plusieurs profondeurs (Rolland et al., 2010). D'autres méthodes plus élaborées estiment d'abord la distribution d'indice de réfraction dans l'échantillon pour corriger les changements de distances perçus, puis combine les données (Srinivasan et al., 2012). Une méthode développée pour le FFOCT s'affranchit complètement du balayage mécanique du focus dans l'échantillon en utilisant une source à balayage et un modèle complexe de déconvolution du signal pour l'OCT (Marks et al., 2007). Cette méthode est toutefois limitée par sa grande sensibilité aux instabilités de phase et par la complexité des calculs qui ralentissent considérablement les mesures.

## 2.3 Origine du contraste en OCT

Que ce soit pour l'OCT ou l'OCM, le signal mesuré provient de l'interférence entre les photons du bras de référence et les photons rétro réfléchis par l'échantillon. Si la différence de parcours optique entre les photons provenant de chaque bras est inférieure à la longueur de cohérence du laser, les photons seront en mesure d'interférer ensemble, sinon leur amplitude sera additionnée et contribuera au signal de fond continu (DC). Plusieurs types d'interactions entre lumière et tissu biologique peuvent affecter l'amplitude du signal rétro réfléché (Jacques, 2013; Tuchin, 2015). Ces interactions sont caractérisées par les propriétés optiques suivantes : le coefficient d'absorption  $\mu_a$ , le coefficient de diffusion  $\mu_s$ , la fonction de phase de diffusion  $p(\hat{s}, \hat{s}')$  donnant la probabilité qu'un photon se propageant dans la direction  $\hat{s}$  soit diffusé vers la direction  $\hat{s}'$ , et l'indice de réfraction du tissu  $n$ . L'absorption peut provenir de plusieurs mécanismes d'excitation et d'émission de la lumière par la matière (Figure 2.5). Par exemple une absorption d'un photon peut être suivie d'une relaxation non radiative, de fluorescence, de phosphorescence, d'une diffusion inélastique de Raman, etc. (L. V. Wang & Wu, 2007). Ces processus ne conservent pas la cohérence du photon émis, donc toute absorption contribue à la baisse du signal rétro réfléché, mais ne fournit pas d'information utile pour l'OCT.

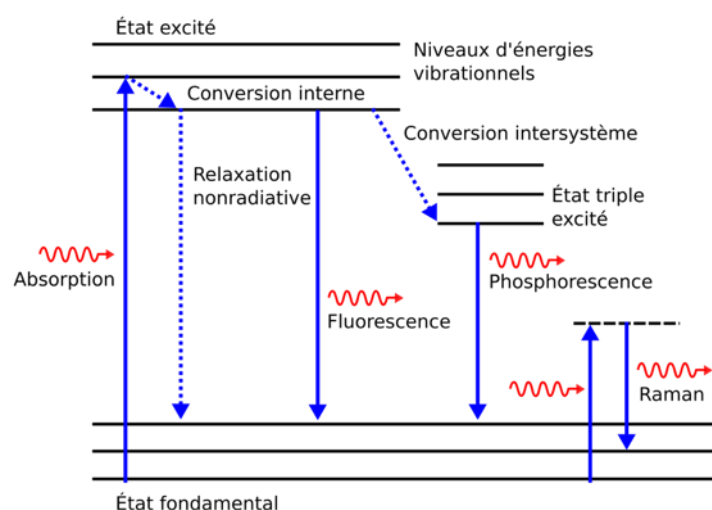


Figure 2.5 Diagramme de Jablonsky représentant l'absorption d'un photon et plusieurs mécanismes de relaxations possibles. Adapté de la figure 1.2 de (L. V. Wang & Wu, 2007)

La diffusion élastique des photons par les tissus peut être décrite par la théorie de Mie lorsque la taille des diffuseurs est du même ordre de grandeur ou plus grande que la longueur d'onde des photons, et décrite par la théorie de Rayleigh dans le cas contraire pour des diffuseurs de diamètre

$d \ll \lambda$ . La théorie de Mie pose également l'hypothèse que les diffuseurs sont sphériques (Jacques, 2013). Dans les échantillons biologiques, la taille des cellules et des structures des tissus varie entre quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres (Tuchin, 2015). Pour les neurones, les principaux composants cellulaires sont les corps cellulaires (soma), les axones et dendrites. Le contenu du tissu neuronal en axones et dendrites est aussi nommé neurite. Certains axones sont également recouverts de couches de myéline. Quelques organelles contribuant à la diffusion de la lumière dans les cellules sont les noyaux cellulaires (diamètre  $\approx 5$ -10 microns), les mitochondries (diamètre  $\approx 1$ -2 micron), lysosomes et peroxysomes (diamètre  $\approx 20$  nm). Quelques organelles cylindriques dans les axones sont les membranes axonales (épaisseur  $\approx 6$ -10 nm), les microtubules (diamètre interne  $\approx 15$  nm et externe  $\approx 25$  nm), les neurofilaments (diamètre  $\approx 10$  nm) et des mitochondries (Tuchin, 2015). La plupart des organelles du corps cellulaire ne sont pas sphériques et sont plutôt représentées par des ellipsoïdes lors des calculs de diffusion. Les organelles axonales sont quant à elles représentées par des diffuseurs cylindriques. Ces organelles contribuent ainsi à l'anisotropie de la diffusion pour les axones. Les couches de myéline possèdent un indice de réfraction élevé ( $n \approx 1,46$ ) par rapport aux neurites ( $n \approx 1,33$ ) (Ben Arous et al., 2011), ce qui augmente la réflectivité optique de la matière blanche. De plus, la myéline peut former plusieurs couches concentriques autour de l'axone (Hildebrand et al., 1993), et chacune s'accompagne de changements d'indice de réfraction qui contribuent à la réflectivité de la structure et augmente donc le contraste des fibres myélinisées en OCT (Jeon et al., 2006).

Ce n'est pas seulement les caractéristiques individuelles des neurones et de leurs organelles qui contribuent au signal, mais également leur organisation structurée en amas de fibres. En effet, l'organisation en amas des axones peut être représentée par un système de longs cylindres diélectriques (Tuchin, 2015). Dans ce cas, la propagation d'une lumière linéairement polarisée dans ce type de milieu accumule un délai de phase s'il y a une différence d'indice de réfraction  $\Delta_{o/p}$  entre les directions orthogonales et parallèles aux fibres. Cet effet est nommé biréfringence et est décrit par le retard de phase

$$\delta_{o/p} = \frac{2\pi d \Delta n_{o/p}}{\lambda_0} \quad (2.11)$$

où  $d$  est la distance parcourue dans le milieu biréfringent. Pour des diamètres de cylindres beaucoup plus petits que la longueur d'onde de la lumière (limite de Rayleigh), la biréfringence d'un amas cylindrique est décrite par (Hemenger, 1989) :

$$\Delta n_{o/p} = (n_p - n_o) = \frac{f_1 f_2 (n_1 - n_2)^2}{f_1 n_1 - f_2 n_2} \quad (2.12)$$

où  $f_1$  et  $f_2$  sont les fractions volumiques des cylindres et du milieu, et  $n_1$ ,  $n_2$  sont leurs indices de réfraction respectifs. Lorsque le diamètre des cylindres est beaucoup plus grand que la longueur d'onde, la biréfringence devient nulle. Le diamètre des diffuseurs anisotropes d'un amas de fibres, de même que la densité de cet amas et son orientation par rapport au faisceau de lumière polarisée incident peuvent tous influencer le contraste mesuré en OCT. En fait, une technique nommée l'OCT sensible à la polarisation (PS-OCT), exploite cet effet pour imager la biréfringence des tissus (Baumann, 2017; de Boer et al., 2017). Cette modalité optique a été utilisée pour cartographier l'orientation des fibres de matières blanches dans des échantillons de cerveaux de rats (H. Wang et al., 2015) et d'humains (H. Wang et al., 2018) et pour mesurer l'orientation de fibres myocardiennes chez la souris (Y. Wang & Yao, 2013).

Les coefficients d'absorption et de diffusion sont fréquemment combinés en un coefficient d'extinction (ou d'atténuation) :  $\mu_T = \mu_a + \mu_s$  exprimé en 1/cm. Dans les tissus biologiques, le coefficient de diffusion est beaucoup plus grand que le coefficient d'absorption ( $\mu_s \gg \mu_a$ ), de sorte que l'absorption est parfois négligée dans les modèles simplifiés d'interaction lumière/tissu en posant  $\mu_T \approx \mu_s$ . La fonction de phase de la diffusion peut s'écrire  $p(\hat{s}, \hat{s}') = p(\theta)$  lorsque la diffusion est symétrique par rapport à la direction de propagation de la lumière incidente (i.e. qu'elle ne dépend que de l'angle  $\theta$  entre la direction incidente  $\hat{s}$  et la direction diffusée  $\hat{s}'$ ). Dans ce cas,  $p(\theta)$  peut être approximée par une fonction de phase d'Henye-Greenstein :

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (2.13)$$

où  $g = \langle \cos \theta \rangle$  est le coefficient d'anisotropie de la diffusion. Tel qu'illustré à la Figure 2.6, une faible valeur de  $g$  correspond à une diffusion isotropique, une valeur négative correspond à de la rétrodiffusion, et une valeur positive à de la diffusion avant. Plus l'anisotropie est élevée et plus la diffusion devient directionnelle. L'anisotropie de la diffusion est observée par exemple dans les tissus structurés comme les fibres musculaires (Fan & Yao, 2013), les tissus osseux corticaux (Ugryumova et al., 2004) et les fibres de matières blanches (Leahy et al., 2013). En particulier pour l'OCT, le contraste est plus élevé dans la matière blanche si les fibres sont orientées perpendiculairement à l'axe de propagation de la lumière que si elles sont parallèles à cet axe. (Bevilacqua et al., 1999) ont estimé les propriétés optiques suivantes pour des nerfs optiques

humains ( $\lambda = 956 \text{ nm}$ ) :  $\mu_a = 0.65 \pm 0.25 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu'_s = 16 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$  et  $g = 0.92$ . Ici, le coefficient de diffusion est exprimé sous forme de coefficient de diffusion réduit :  $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$ .

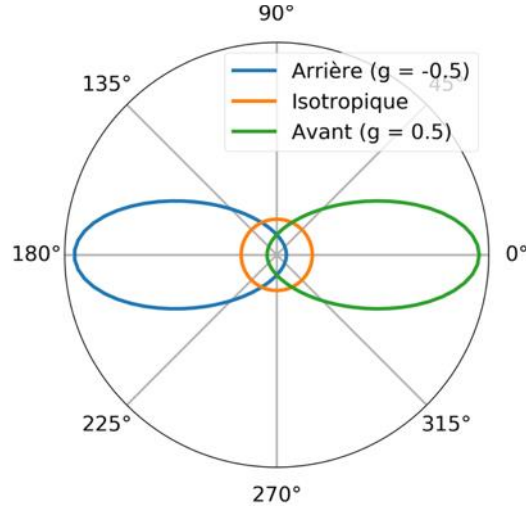


Figure 2.6 Fonction de phase d'Heney-Greenstein.

### 2.3.1 Modèles d'interaction à une seule diffusion

Le modèle le plus simple pour décrire l'effet d'un tissu homogène sur l'intensité d'un faisceau se propageant dans ce milieu est la loi de Beer-Lambert (Tuchin, 2015; van Gemert et al., 1989) :

$$I(z) = (1 - R_F)I_0 \exp(-\mu_t z) \quad (2.14)$$

où  $R_F$  est la réflexion de Fresnel entre le milieu environnant et le tissu,  $I_0$  est l'intensité initiale du faisceau et  $z$  est la distance parcourue dans le tissu. Ce modèle considère que les photons subissent au plus un seul événement de diffusion au cours de la propagation et que le tissu est homogène. Pour le signal mesuré par OCT, il faut considérer l'atténuation subie lors de la propagation du photon allant de l'objectif vers l'échantillon, et l'atténuation survenant pour le parcours inverse allant de l'échantillon vers l'objectif. Ainsi, pour un tissu homogène le signal OCT est décrit par :  $I(z) \propto e^{-2\mu_t z}$ . Dans ce cas, une transformation logarithmique des profils d'intensité mesurés par l'OCT suffit à extraire le coefficient d'atténuation (Vermeer et al., 2014).

$$\hat{\mu} = -\frac{1}{2} \frac{d \log(I(z))}{dz} \quad (2.15)$$

Toutefois, pour éviter les erreurs introduites lors du calcul des dérivées en présence de bruit, le coefficient d'atténuation est fréquemment estimé par régression d'une exponentielle sur les profils d'intensité OCT.

Le modèle précédent pose l'hypothèse que le tissu est homogène, ce qui n'est pas toujours le cas. Une extension du modèle de Beer-Lambert qui considère toujours qu'un seul événement de diffusion affecte les photons au cours du parcours est (Hughes & Duck, 1997; Vermeer et al., 2014) :

$$I(z) = I_0 R(z) e^{-2 \int_0^z \mu_T(u) du} \quad (2.16)$$

Où  $R(z)$  et  $\mu_t(z)$  sont respectivement les profils de réflectivité et d'atténuation de l'échantillon en fonction de la profondeur. Le profil de réflectivité est ce qu'on cherche à mesurer en OCT. Pour extraire le profil d'atténuation  $\mu_T(z)$ , (Vermeer et al., 2014) posent quelques hypothèses : (1) uniquement les photons ayant subi 1 seul événement de diffusion contribuent à l'atténuation du signal, (2) les photons rétrodiffusés sont une fraction constante  $\alpha$  des photons atténués à une profondeur donnée ( $R(z) = \alpha \mu_T(z)$ ) et (3) la majorité des photons est diffusée rendu à la fin de l'étendue axiale des A-Lines OCT ( $I(z_{max}) \rightarrow 0$ ). En utilisant ces hypothèses et un peu d'algèbre, on trouve un nouvel estimateur du coefficient d'atténuation résolu axialement (Hughes & Duck, 1997; Vermeer et al., 2014) :

$$\hat{\mu}_T(z) = \frac{I(z)}{2 \int_z^\infty I(u) du} \approx \frac{I(z)}{2 \int_z^{z_{max}} I(u) du} \quad (2.17)$$

Les trois hypothèses posées pour obtenir cet estimateur du coefficient d'atténuation ne sont pas toujours respectées. Par exemple, lorsque l'intensité à la limite axiale d'une A-line n'est pas nulle telle que le suppose l'hypothèse 3 du modèle, l'atténuation diverge plus  $z$  s'approche de  $z_{max}$ . Pour amoindrir cet effet, (Hohmann et al., 2015) ont adapté le modèle de Vermeer en estimant d'abord l'atténuation d'une A-Line entière par régression d'une exponentielle, puis en extrapolant le signal au-delà de la limite axiale du profil d'intensité pour simuler une A-Line de plus grande étendue pour laquelle le signal  $I(z_{max})$  tend vers zéro. Une technique similaire a été développée pour l'article présenté dans cette thèse (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017). En séparant l'intégrale du dénominateur dans le modèle de Vermeer entre les intervalles  $[z, z_{max}]$  et  $[z_{max}, \infty[$ , et en estimant le coefficient d'atténuation moyen  $\langle \mu_T \rangle$  d'une A-Line à l'aide de l'équation 2.15, on obtient :

$$\begin{aligned}\hat{\mu}_T(z) &= \frac{I(z)}{2 \left[ \int_z^{z_{max}} I(u) du + I(z_{max}) \int_{z_{max}}^{\infty} e^{-2\langle\mu_T\rangle(u-z_{max})} du \right]} \\ &= \frac{I(z)}{2 \int_z^{z_{max}} I(u) du + \frac{I(z_{max})}{\langle\mu_T\rangle}}\end{aligned}\quad (2.18)$$

Deux aspects à considérer lors des mesures de l'atténuation sont (1) la décroissance de la sensibilité avec la profondeur du signal due aux mesures dans le domaine de Fourier (Équation 2.5), et (2) la variation induite par le faisceau gaussien du contraste avec la profondeur. Cette variation du contraste est donnée par la PSF confocale.

$$h(z) = \left[ \left( \frac{z - z_f}{z_R} \right)^2 + 1.0 \right]^{-1} \quad (2.19)$$

où  $z_f$  est la position axiale du plan focal, et  $z_R$  est la longueur de Rayleigh. Cette PSF axiale doit d'abord être compensée dans le signal avant d'estimer le profil d'atténuation. Les paramètres  $z_f$  et  $z_R$  peuvent être mesurés directement à partir de 2 profils OCT d'une même structure acquis à deux profondeurs différentes (Dwork et al., 2016). Ils peuvent également être estimés directement à partir des données par régression pour des échantillons homogènes.

Les modèles présentés dans cette section pour décrire l'interaction des photons avec le tissu considèrent tous un faisceau de lumière monochromatique. Pour plusieurs longueurs d'onde, il faut considérer dans le modèle les changements de propriétés optiques des tissus avec l'énergie du photon. Par exemple (Jacques, 2013) a recensé les propriétés optiques de plusieurs tissus biologiques et utilise le modèle paramétrique suivant pour estimer le coefficient de diffusion réduit en fonction de la longueur d'onde.

$$\mu'_s(\lambda) = a' \left( f_{Ray} \left( \frac{\lambda}{500 \text{ (nm)}} \right)^{-4} + (1 - f_{Ray}) \left( \frac{\lambda}{500 \text{ (nm)}} \right)^{-b_{Mie}} \right) \quad (2.20)$$

où  $f_{Ray}$  est la fraction provenant de la diffusion de Rayleigh, et  $a'$  et  $b_{Mie}$  sont des paramètres qui sont calculés à partir de mesures expérimentales. Les autres propriétés optiques dépendent également de la longueur d'onde de la lumière. Une technique d'OCT exploitant cette variation des coefficients de diffusion est l'OCT spectroscopique (Leitgeb et al., 2005; Lenz et al., 2017; Morgner et al., 2000; Xu et al., 2006).

Un effet important à mentionner pour l'OCT est la dispersion chromatique de la lumière causée par les variations d'indice de réfraction des matériaux traversés. En effet, des photons de différentes



énergies se propagent à des vitesses différentes dans les matériaux, de sorte qu'un décalage de phase  $e^{i\theta(k)}$  s'accumule le long du parcours optique entre chaque longueur d'onde contenue dans le spectre de la source. Ceci se manifeste par un étalement de la PSF axiale dans le signal OCT reconstruit. Une façon de corriger cet effet est d'introduire des éléments dispersifs dans le bras de référence pour que les retards de phase soient les mêmes dans chaque bras de l'OCT. En FD-OCT, puisque le patron d'interférence est mesuré en fonction du nombre d'ondes, il est également possible de corriger la dispersion numériquement à l'aide de différents algorithmes (Lippok et al., 2012; Marks et al., 2003; Wojtkowski et al., 2004).

### 2.3.2 Modèles d'interaction à plusieurs diffusions

Les modèles considérant 1 seul événement de diffusion sont adéquats lorsque les mesures sont limitées aux profondeurs près de l'interface air/tissu. Pour modéliser les photons se propageant plus profondément, il faut utiliser un modèle plus complexe considérant les multiples événements de diffusion et les propriétés optiques du tissu tel que la fonction de phase  $p(\hat{s}, \hat{s}')$ , le coefficient de diffusion  $\mu_s$  et le coefficient d'absorption  $\mu_a$ . Trois approches théoriques ont été étudiées pour décrire le signal OCT à grande profondeur : la méthode du transfert radiatif (RTT), le modèle de Huygens-Fresnel étendu (EHF) et la modélisation par Monte Carlo. La première approche (RTT) décrit la propagation d'une lumière monochromatique dans un milieu homogène (Arridge & Schotland, 2009; Tuchin, 2015) par

$$\frac{\partial I(\mathbf{r}, \hat{s})}{\partial s} = -(\mu_a + \mu_s)I(\mathbf{r}, \hat{s}) + \mu_s \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \hat{s})p(\hat{s}, \hat{s}')d\Omega' \quad (2.21)$$

Où  $\mathbf{r}$  désigne une position spatiale dans le milieu et  $d\Omega'$  est un angle solide unitaire dans la direction  $\hat{s}'$ . En posant l'hypothèse des petits angles de diffusion, (Turchin et al., 2005) ont utilisé cette théorie pour extraire les propriétés optiques des tissus à partir de mesures OCT. Ils ont montré qu'il est possible d'extraire les propriétés optiques  $\mu_s$ , la probabilité de réflexion  $p_b$  et l'angle moyen de diffusion  $\langle \gamma^2 \rangle$  dans certaines conditions pour des tissus formés d'une seule couche. Un résultat intéressant de leur analyse est la description par un nombre adimensionnel du diamètre optique du faisceau d'échantillon.

$$D = \frac{3\mu_s a}{\sqrt{\langle \gamma^2 \rangle}} \quad (2.22)$$

Où  $a$  est le diamètre du faisceau. Les auteurs ont montré qu'il était seulement possible de séparer avec une bonne précision les paramètres  $\mu_s$ ,  $p_b$  et  $\langle \gamma \rangle$  pour un faisceau optiquement mince ( $D \ll 1$ ). Pour un faisceau optiquement large ( $D \gg 1$ ), le signal est dominé par la diffusion de photons (*multiple scattering*) et les décroissances exponentielles du signal sont décrites par les produits  $p_b \mu_s$  et  $\langle \gamma^2 \rangle \mu_s$ . Les auteurs ont utilisé un algorithme génétique pour optimiser l'équation intégrale décrivant le signal OCT avec ce modèle. Les temps de calcul pour effectuer la régression du modèle pour une seule A-line était de  $< 1$  minute pour 1 couche de tissu et  $\approx 1.5$  minute pour 2 couches de tissu. Cette technique n'est donc pas adaptée pour estimer les propriétés optiques pour des volumes OCT entiers.

Un second modèle pour décrire le signal OCT en condition de multiple événement de diffusion est basée sur la théorie de Huygens-Fresnel étendue (Andersen et al., 2008; Levitz et al., 2004; Thrane et al., 2004). Pour un OCT opéré en mode temporel avec un focus fixe, et en posant l'hypothèse que la rétro réflexion est très faible ( $p_b \ll 1$ ), le signal mesuré par le détecteur est alors décrit par  $I_D(z) = I_o(z)\Psi(z)$  où  $I_o(z)$  est le signal qui serait mesuré en absence de diffusion et  $\Psi(z)$  est le facteur d'efficacité hétérodyne décrit par

$$\Psi(z) = e^{-2\mu_s z} + \frac{4e^{-\mu_s z}(1 - e^{-\mu_s z})}{1 + \frac{w_s^2}{w_H^2}} + (1 - e^{-\mu_s z})^2 \frac{w_H^2}{w_s^2} \quad (2.23)$$

Où le premier terme représente la contribution des photons ayant été diffusés une seule fois, le dernier terme les photons ayant été diffusés plusieurs fois et le 2<sup>e</sup> terme est un mélange des photons balistiques et des photons diffusés plusieurs fois. Les variables  $w_H^2$  et  $w_s^2 = w_H^2 + \left(\frac{\lambda B}{\pi \rho_0}\right)^2$  décrivent le diamètre du faisceau de lumière en l'absence et avec diffusion respectivement. La variable B est un élément de la matrice ABCD décrivant la propagation du faisceau échantillon dans le formalisme de l'optique géométrique, et  $\rho_0$  est la fonction de cohérence latérale

$$\rho_0(z) = \sqrt{\frac{3}{\mu_s z} \frac{\lambda}{\pi \sqrt{2(1-g)}}} \left( \frac{nB}{z(1-2p_b)} \right) \quad (2.24)$$

Pour de faibles profondeurs de mesure, le signal sera dominé par la diffusion à un seul photon. Puis, l'intensité du signal OCT sera progressivement dominée par les événements de diffusions multiples plus la zone imagée est profonde dans le tissu. Une conséquence de la diffusion multiple est que c'est seulement près de l'interface air/tissu qu'il est possible d'obtenir un point focal limité par la diffraction. Un point focal sera dégradé par la diffusion plus le parcours dans le tissu est

profond. De plus, ce modèle permet de reproduire l'effet optique de type « rideau de douche » (*Shower-curtain effect*, (Edrej & Scarcelli, 2016; Tremblay et al., 2015)), selon lequel la résolution latérale est plus petite si le milieu diffusant est plus près de la source. Cet effet est nommé en référence au film *Psycho* d'Alfred Hitchcock, et l'effet rideau de douche est une autre raison pour laquelle la résolution latérale décroît avec la profondeur en OCT à grand NA.

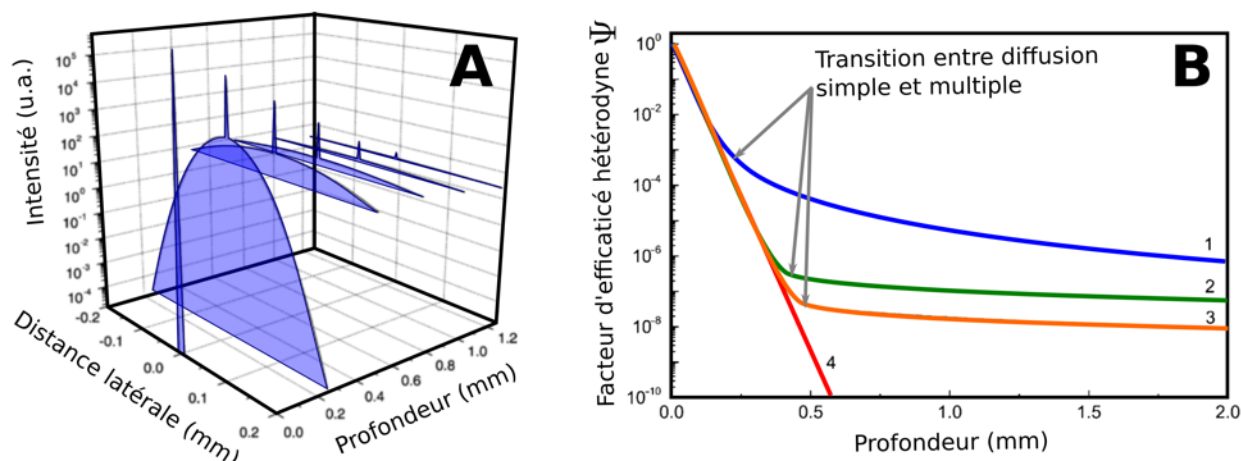


Figure 2.7 (A) Étalement d'un point focal avec la profondeur due à la diffusion multiple dans les tissus. (B) Facteur d'efficacité hétérodyne obtenu pour la rétrodiffusion considérant l'effet « rideau de douche » (bleu), une réflexion spéculaire (orange), une rétrodiffusion sans effet « rideau de douche » (vert), et une rétrodiffusion à un seul événement de diffusion (rouge).

Adaptation des figures 2.3 et 2.4 de (Andersen et al., 2008)

Tout comme pour le modèle utilisant la théorie du transfert radiatif, les propriétés optiques des tissus sont extraites par régression du modèle hétérodyne sur le signal. (Thrane et al., 2004) ont fait la démonstration que ce modèle est en mesure d'extraire les paramètres optiques pour un fantôme numérique formé de 1 ou 2 couches de tissus homogènes. Leur technique suppose toutefois que le tissu est formé de couches uniformes dont le nombre, la position et l'épaisseur sont connus.



signal (*k-clock*) qui permet d'enregistrer les interférogrammes avec un échantillonnage linéaire selon le nombre d'onde  $k = 2\pi/\lambda$ , ce qui est une des contraintes imposées par le modèle de reconstruction des données FD-OCT. La sortie laser est envoyée à un coupleur à fibre 90/10 (FC). 90% de la puissance du laser est dirigée vers le bras de l'échantillon et 10% vers le bras de référence. Des circulateurs optiques dans chaque bras guident la lumière vers des collimateurs à fibres optiques (COL). Ces mêmes collimateurs et circulateurs collectent la lumière réfléchie dans chaque bras. Un contrôleur de polarisation (PC) placé dans le bras de référence sert à ajuster le contraste des franges d'interférence. Les signaux de référence et d'échantillon sont combinés dans un coupleur de fibres 50/50 et envoyés à un photodétecteur équilibré (BPD). Les franges d'interférence sont enregistrées sur un ordinateur à l'aide d'un numériseur d'onde 12 bits rapide (ADC, Alazartech). L'acquisition des franges d'interférence a été réalisée à l'aide du module Python du numériseur d'onde (Alazartech Python SDK version 7.1.5).

### 3.1.2 Bras d'échantillon 3X et 40X

Le bras échantillon du SOCT était initialement composé d'un système de miroirs galvanométriques pour balayer le faisceau latéralement sur l'échantillon, ainsi que d'un télescope pour ajuster le diamètre du faisceau et pour diriger la lumière vers un objectif télécentrique 3X. Puisque cet objectif est conçu pour être utilisé dans l'air, une chambre d'immersion était placée entre l'objectif et l'échantillon. Elle consistait en une lamelle de microscope fixée sur un tube optique par de la colle époxy. La chambre d'immersion a été modifiée pour utiliser une fenêtre optique recouverte d'une couche mince antireflet pour les longueurs d'onde proche infrarouges et dont l'une des faces est légèrement inclinée. Ceci permet de réduire la réflexion du faisceau lorsque la lumière traverse les interfaces air/verre et verre/eau. Une seconde modification de l'OCT consiste en l'ajout d'un second bras échantillon. Un miroir amovible, placé entre les 2 lentilles du télescope 3X, redirige le faisceau vers un miroir 45° et une troisième lentille, créant ainsi un télescope pour le second bras échantillon. Le faisceau est ensuite focalisé sur l'échantillon par un objectif à eau 40X (Nikon).

Quelques contraintes de conception ont été considérées lors de l'ajout de l'OCM. D'abord une contrainte optique provient du fait que l'ouverture numérique, le grossissement et la longueur focale des objectifs de microscope sont calculés pour des géométries de faisceaux spécifiques. Par exemple, les caractéristiques de l'objectif de microscope 3X (LSM04, Thorlabs) sont définies pour un faisceau de diamètre  $d \approx 4 \text{ mm}$ , et l'objectif de microscope 40X (Nikon) nécessite un faisceau

de diamètre  $d \approx 8 \text{ mm}$ . De plus, puisque l'objectif 3X est télécentrique, la focale de la seconde lentille du télescope 3X doit être positionnée à une distance de 18,9 mm de la pupille d'entrée du microscope alors que la focale de la seconde lentille du télescope 40X doit coïncider avec la pupille d'entrée de l'objectif 40X. Une autre contrainte dont il faut tenir compte pour le bras OCT 3X est la modification de la distance focale induite par l'air et le verre traversé dans la chambre d'immersion et l'épaisseur de la colonne d'eau entre le verre et l'échantillon. Il faut aussi considérer que les deux bras échantillons sont conçus avec un système de cage optique de 30 mm et qu'ils sont positionnés verticalement au-dessus du support à échantillon. Les cages sont maintenues en place par des plateformes de 95mm de largeur fixées à un rail vertical de même taille. Ces structures optomécaniques imposent des contraintes supplémentaires sur les distances possibles entre les bras échantillons.

Les longueurs focales des 3 lentilles du système, la distance entre les bras (D), et la distance entre l'objectif 3X et la fenêtre optique de la chambre d'immersion (H) ont été déterminées par une recherche exhaustive parmi toutes les configurations possibles étant données les contraintes mentionnées plus haut. Les longueurs focales ont été limitées aux lentilles offertes dans le catalogue de Thorlabs. Le but de l'optimisation était de minimiser la distance entre la position axiale des plans focaux 3X et 40X, et d'obtenir des diamètres de faisceau près des tailles prescrites pour chaque objectif. Une optimisation mathématique a d'abord été réalisée, pour laquelle la distance entre les plans focaux et la taille des faisceaux ont été classées selon leurs écarts aux valeurs cibles. Puis, les configurations se rapprochant le plus du cas idéal ont été comparées manuellement pour choisir l'option à implémenter. Le tableau suivant et la Figure 3.2 présentent les caractéristiques optiques retenues suite à l'optimisation optomécanique. Le choix de ces composants résulte en une distance  $d = 6.5 \text{ mm}$  entre les plans focaux de l'objectif 3X et 40X, un diamètre de faisceau d'environ 4.25 mm à l'entrée de l'objectif 3X et d'environ 7 mm à l'entrée de l'objectif 40X.

*Tableau 3.1 Distances optimisées des composants du microscope*

Composant	Valeur
Distance entre les bras (D)	50 mm
Longueur de la chambre d'immersion (H)	40 mm
Lentille L1,3X	60 mm

<b>Lentille L2,3X</b>	75 mm
<b>Lentille L2,40X</b>	125 mm

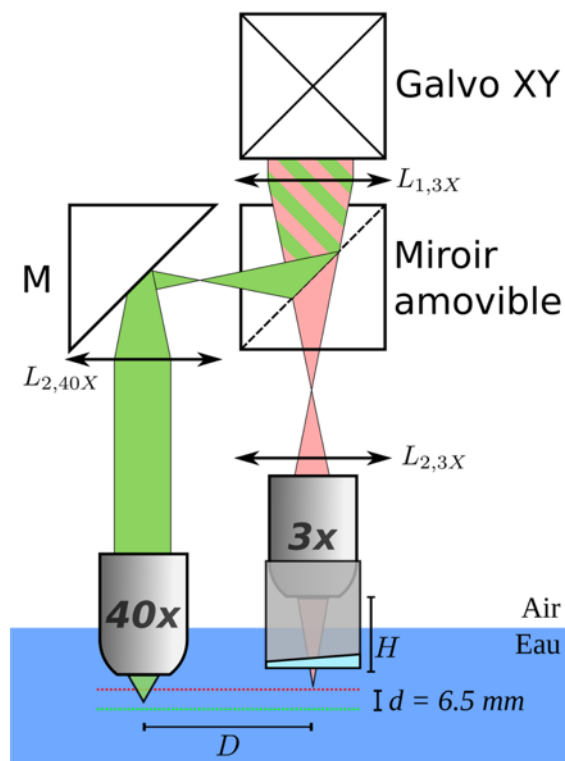


Figure 3.2 Représentation schématique du bras échantillon. Les distances ne sont pas à l'échelle.

### 3.1.3 Bras de référence

Le bras de référence de l'OCT a été modifié de façon similaire au bras d'échantillon en insérant un miroir 45° amovible à la sortie du collimateur pour dévier le faisceau vers un second miroir de référence. La distance a été ajustée afin de représenter le parcours supplémentaire de la lumière vers l'objectif 40x. Le faisceau de référence traverse 4 prismes de verre N-BK7 servant à compenser physiquement la différence de dispersion chromatique entre les bras de référence et d'échantillon. Dans le bras 3X, la dispersion de l'objectif est compensée avec un élément dispersif conçu spécifiquement pour l'objectif 3X utilisé. L'intensité du signal dans chaque bras de référence est également ajustée avec des filtres atténuateurs à densité neutre (ND).

### 3.1.4 Automatisation

Lors de la première version du système 2R-SOCT, le changement de bras pour l'interféromètre était réalisé avec des blocs amovibles contenant des miroirs à 45°. Ces composants optomécaniques possèdent l'avantage d'être compatibles avec les systèmes de cages utilisés pour concevoir le microscope, ce qui simplifie grandement l'alignement du faisceau. Toutefois, l'objectif global du système bi-résolution étant d'acquérir des cerveaux de souris entiers avec l'OCT 3X et de cibler automatiquement des régions d'intérêts à imager avec l'OCM 40X, la transition entre les deux modalités d'imagerie devait pouvoir être contrôlée par ordinateur. Or, les blocs amovibles devaient être retirés et remplacés manuellement. Ils ont donc été remplacés par des supports à miroir motorisés (FM). Ces dispositifs possèdent 2 positions (0° et 90°) permettant de placer et de retirer un miroir dans le parcours du faisceau. Ils peuvent être contrôlés via USB à l'aide d'un protocole de communication série. Un désavantage de ce support motorisé est qu'il n'est ni compatible avec un système de cage, ni avec la table optique utilisée pour aligner les bras de référence. Il faut ainsi aligner le miroir manuellement, puis compenser les erreurs d'orientation et de position avec les autres composants optiques du système. Le moteur et son système de contrôle occupent plus d'espace, ce qui est a été une contrainte supplémentaire à considérer pour la disposition des bras échantillons.

Au point de vue de l'acquisition, l'automatisation complète des mesures 2R-SOCT a nécessité l'ajout de plusieurs couches de contrôle logiciel pour : (1) les déplacements de l'échantillon entre les bras 3X/40X, (2) les miroirs motorisés (3) l'adaptation des profils de balayage des miroirs galvanométriques selon l'objectif utilisé, (4) le contrôle des différents schémas d'acquisition selon le type de microscope (focus fixe / dynamique, 1 seule position / mosaïque, reconstruction en ligne / hors-ligne ...) et finalement (5) pour la sélection manuelle et automatique des régions d'intérêt à imager avec le microscope. Tous les protocoles de contrôle ont été développés en python.

### 3.1.5 Reconstruction des données

L'acquisition d'un volume OCT est faite en balayant le faisceau latéralement à la surface des échantillons à l'aide des miroirs galvanométriques. Un patron d'interférence est mesuré à chaque position latérale à l'aide du convertisseur analogique numérique. Un patron d'interférence (ou A-Line) est discrétisé en 1152 points répartis sur 100 nm autour de la longueur d'onde centrale de balayage du laser. Les mesures sont séparées linéairement selon leur nombre d'onde. Le balayage



des miroirs galvanométriques est fait à une fréquence de 50 kHz et est contrôlé par une carte d'acquisition de National Instruments. Le profil de déplacement des miroirs est de type trame (*raster scan*), c'est-à-dire qu'un miroir balaie rapidement l'image dans une direction, puis retourne au début de la ligne pendant que le second miroir ajuste d'un petit d'angle sa position. En répétant ce motif pour les axes lent et rapide, un volume entier est couvert en environ 6 sec. Pour éviter les problèmes dus au moment d'inertie des miroirs pour les scans rapides, le retour de du miroir galvanométrique de l'axe rapide est réalisé avec un profil polynomial et en posant que les première et seconde dérivées du signal doivent être nulles à la transition entre le balayage linéaire et le retour polynomial. En plus de la position des miroirs, un signal numérique permet de mesurer les franges d'interférence dans la zone linéaire de l'axe rapide uniquement.

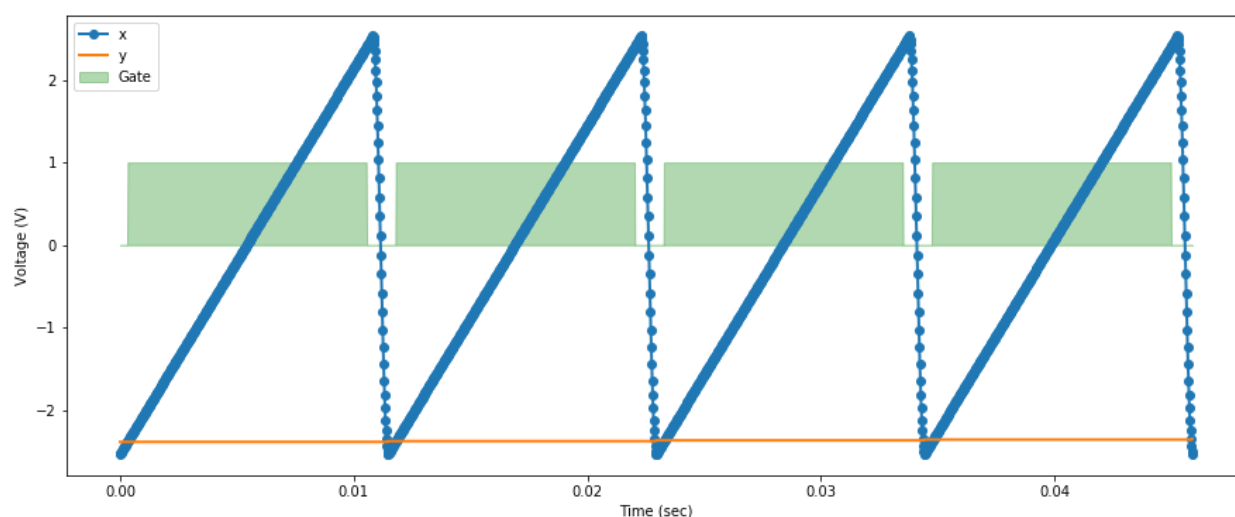


Figure 3.3 Exemple du signal envoyé aux miroirs galvanométriques. Les mesures des franges d'interférence (indiquée par la variable « gate ») sont seulement faites durant la partie linéaire du mouvement de l'axe rapide.

Toutes les mesures pour un volume sont conservées sur la carte Alazartech en mémoire tampon. Par la suite, les données sont transférées vers l'ordinateur de contrôle. Une frange d'interférence moyenne est calculée, puis soustraite à chacune des franges du volume. Ceci permet d'enlever la contribution de l'arrière-plan. Une fonction de fenêtrage gaussienne ( $\mu = 1310$  nm et  $\sigma = 20$  nm) est multipliée avec les franges pour réduire les lobes secondaires causés par la forme du spectre du laser. Dans une dernière étape, le signal OCT est calculé par la transformée de Fourier inverse de chaque frange. Seule la moitié des profils de réflectivité obtenus est conservée étant donné que le

signal est réel et donc que sa transformée de Fourier est symétrique. Les données sont ensuite enregistrées sur disque sous format Nifti.

Pour les mesures à haute résolution du bras 40X, deux types d'acquisition ont été réalisés. D'abord, une acquisition avec un focus fixe dans l'échantillon, pour lequel les mesures et la reconstruction sont les mêmes que pour les volumes OCT 3X. Le deuxième type d'acquisition utilise un focus dynamique. Pour ce type de mesure, le plan focal est d'abord positionné à l'interface eau/tissu de l'échantillon, puis un volume OCT est acquis à plusieurs profondeurs du plan focal dans l'échantillon, chacun espacé de 16 microns. Les données dans ce cas sont enregistrées sur disque directement, sans les reconstruire pour accélérer les mesures. La profondeur du plan focal dans l'échantillon est modifiée en ajustant la hauteur du support motorisé.

Les volumes OCM sont assemblés à partir des séquences de volumes OCT 40X obtenus à plusieurs profondeurs dans l'échantillon (Figure 3.4). Les profils de réflectivité sont d'abord calculés pour chaque volume selon la même méthode que pour l'OCT 3X. Ensuite, le troisième volume 40X dans une série est sélectionné et le plan focal est extrait des données en détectant d'abord la position de l'intensité maximale pour chaque A-line, puis en faisant la régression d'une surface quadratique sur les profondeurs calculées. Pour chaque volume OCT dans la série, la profondeur du plan focal est estimée en calculant la corrélation du signal avec la surface quadratique déplacée axialement à plusieurs profondeurs. La profondeur associée à la corrélation la plus élevée est choisie comme correspondant au plan focal d'un volume. Enfin, les volumes OCM sont assemblés en calculant des poids de mélange (*blending weights*) de formes trapézoïdales, et en utilisant les plans focaux détectés pour chaque volume OCT associés aux limites de fusion de chaque image. Cette méthode, aussi nommée OCT en mode C, utilise la technique de fusion de Gabor présentée par (Rolland et al., 2010).

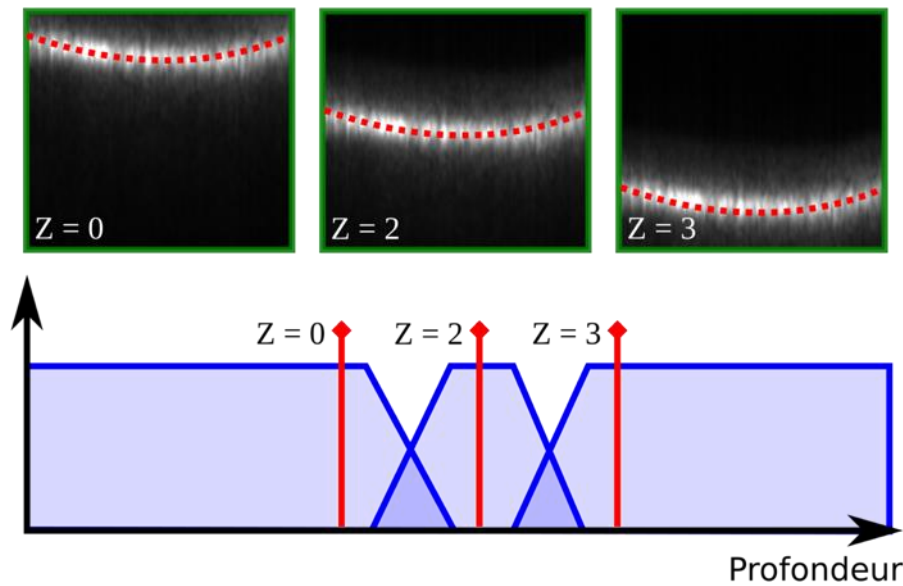


Figure 3.4 Représentation schématique de l'assemblage d'un volume OCM par la méthode de fusion de Gabor. La position des plans focaux (lignes rouges pointillées) est utilisée pour calculer les poids de mélange (trapèzes bleus) pour chaque volume OCT.

### 3.1.6 Caractérisation de l'OCT

La résolution latérale de l'OCT 3X a été mesurée de 3 façons différentes. La première méthode emploie une cible de résolution de type USAF1951, qui est formée de plusieurs paires de lignes qui sont progressivement plus rapprochées. Les paires de lignes (ou éléments) sont exprimées en paires de lignes par millimètre et sont réunies par groupe, chaque groupe représentant des résolutions plus petites que le groupe précédent. Le dernier élément visible, c'est-à-dire pour lequel il est possible de distinguer visuellement les lignes, permet d'évaluer la résolution d'un système d'imagerie. Pour l'OCT 3X, le dernier élément visible était le groupe 5 élément 6 (57 paires de lignes par mm), ce qui correspond à une résolution latérale de 17.54 microns. Une autre cible a été utilisée pour mesurer la résolution axiale et latérale de l'OCT 3X (Arden Photonics). Il s'agit d'un bloc de silice microgravé par lithographie à l'aide d'un laser femtoseconde pulsé. Le fantôme OCT possède 4 groupes de gravures servant à évaluer la PSF du système, sa sensibilité, la résolution latérale et la distorsion. La PSF de l'OCT 3X a ainsi été mesurée, et a permis d'évaluer une résolution axiale  $r_z = 12 \mu m$  et latérale  $r_{xy} = 17.5 \mu m$ . Une dernière façon d'évaluer indirectement la résolution latérale d'un OCT est à partir des paramètres du faisceau gaussien. Pour cette technique, un bloc d'agarose a été imagé. La PSF confocale du faisceau gaussien (Équation

2.19) a été régressée sur le profil d'intensité moyen dans l'agarose en considérant un coefficient d'atténuation négligeable par rapport à la PSF confocale. Ceci a permis de mesurer la longueur de Rayleigh  $z_R = 665 \mu m$  pour l'OCT 3X. La résolution latérale peut alors être calculée en considérant que  $z_R = \pi w_0^2 / \lambda$ , d'où  $r_{xy,gauss} \approx 16.7 \mu m$ .

Pour l'OCT 40X, la résolution latérale était plus petite que le dernier élément présent sur la cible, donc un critère différent a dû être utilisé. Le critère est basé sur la mesure du profil d'intensité le long d'une transition nette entre une zone claire et une zone sombre dans l'image (*Edge response*). La résolution du système est alors définie par la distance entre les valeurs 10% et 90% le long du profil d'intensité normalisé. En utilisant ce critère, une résolution latérale de  $1.3 \mu m$  a été mesurée pour l'OCT 40X. La résolution axiale a quant à elle été évaluée en plaçant un miroir au plan focal et en mesurant la distance à mi-hauteur de son pic de réflectivité (FWHM). Une résolution axiale de  $r_z = 7 \mu m$  a été évaluée pour l'OCT 40X.

### 3.2 Système d'histologie sérielle basée sur l'OCT

Le microscope OCT bi-résolution est couplé à un système d'histologie motorisé afin d'acquérir des cerveaux de souris entiers à haute résolution, et ce, malgré les champs de vue du microscope qui sont de taille limitée. Le système d'imagerie histologique est utilisé en mode *blockface*, c'est-à-dire que les volumes OCT sont acquis avant de trancher le tissu. Pour référence, en histologie conventionnelle le tissu est d'abord sectionné en fines tranches qui sont par la suite imagées après plusieurs étapes intermédiaires de fixation et de marquages des tissus par des agents de contraste. L'avantage de l'histologie *blockface* en comparaison de l'histologie conventionnelle est une diminution des déformations induites par la coupe, une réduction des manipulations de l'échantillon, et des procédures de préparation des échantillons moins complexes.

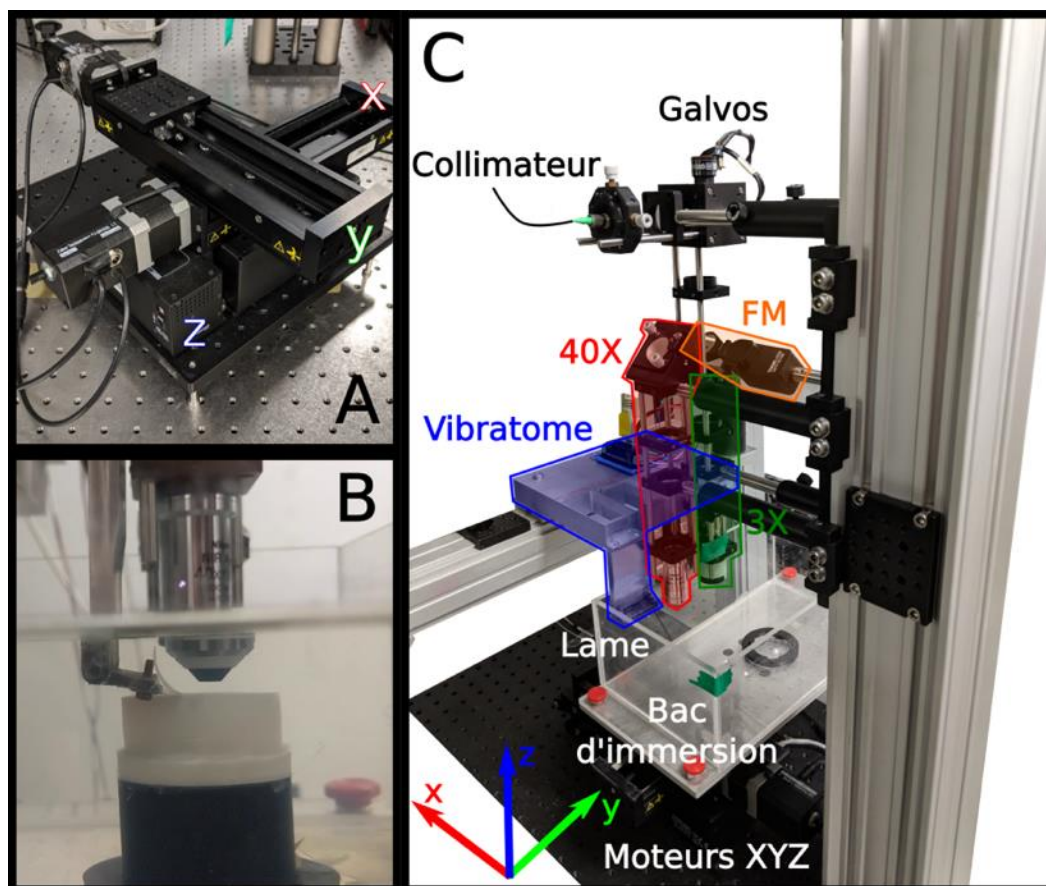


Figure 3.5 Système d'histologie par OCT bi-résolution. (A) Disposition des moteurs linéaires. (B) Vibratome en fonction. (C) Disposition des composants du système d'imagerie. Les régions de couleurs indiquent la position du vibratome (bleu), de l'OCT 40X (rouge), de l'OCT 3X (vert) et du miroir motorisé utilisé pour changer d'OCT (orange).

La plateforme d'histologie consiste en un support à échantillon motorisé et un vibratome pour trancher les cerveaux (Figure 3.5). Le support à échantillon est formé d'un élévateur motorisé (déplacements Z) sur lequel sont fixés deux supports linéaires motorisés (déplacements X et Y) (Figure 3.5A). Ces moteurs sont contrôlés à l'aide d'un protocole de communication série et sont en mesure de fournir des positions précises au micron près. Un bac à immersion en acrylique est fixé sur le dernier support linéaire (Y) via une plaque d'aluminium. Au centre du bac, un support à échantillon imprimé en 3D permet de positionner les blocs d'agarose au même endroit pour chaque session d'imagerie. Le bac d'immersion est rempli d'eau durant les mesures pour permettre aux tranches de tissu de se déplacer vers le fond du bac lors des coupes et ainsi révéler de nouvelles zones à imager. Cela permet également de pouvoir utiliser l'objectif 40X à immersion. Le vibratome est formé d'un moteur rotatif et d'un arbre décentré. La rotation décentrée est transférée

au support de lame par une flexure dont la rigidité est élevée dans une direction et faible dans l'autre. Ainsi, les rotations décentrées sont converties en translation selon un seul axe. Cette translation est transférée à une lame de rasoir fixée par un support au vibratome. L'angle de la lame peut être ajusté sur le support. Les coupes sont réalisées en plaçant l'échantillon en face de la lame, en faisant fonctionner le vibratome à une fréquence de 60 Hz, puis en déplaçant lentement l'échantillon vers la lame (1 mm/s) jusqu'à ce qu'une tranche 200 microns soit retirée (Figure 3.5B).

La plateforme d'histologie utilisée au début de ce projet de doctorat a été conçue par Alexandre Castonguay. Les données du premier article présenté au Chapitre 4 ont été obtenues avec l'ancienne plateforme. Par la suite, le système a été modifié pour accueillir le nouveau microscope OCT bi-résolution, ce qui est présenté au Chapitre 5 portant sur le second article de cette thèse. Voici de façon détaillée les contributions de cette thèse au système d'histologie :

- Conception d'un nouveau bassin d'immersion et d'un nouveau support pour le bassin afin d'accueillir les 2 bras du microscope OCT bi-résolution, en plus du vibratome.
- Conception et optimisation d'un nouveau support pour l'échantillon.
- Conception et optimisation d'un nouveau moule pour l'agarose servant de matrice de support pour l'échantillon à trancher.
- Nouveau module Python pour contrôler le système d'histologie (vibratome, moteurs XY, moteur Z, procédures de déplacement, calibration et automatisation des mesures).
- Module Python pour réaliser les mesures 2R-SOCT (conception, calibration, acquisition, reconstruction et analyse).
- Module Python pour aligner et assembler les volumes OCT en un seul cerveau.

La suite de cette section décrit (1) les protocoles de préparation des tissus, (2) l'acquisition 2R-SOCT et (3) l'assemblage des données.

### **3.2.1 Préparation des tissus**

Toutes les procédures chirurgicales furent acceptées par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Institut de Cardiologie de Montréal et sont en accord avec les recommandations du conseil canadien de protection des animaux. Les échantillons imaged pour cette thèse étaient des

cerveaux de souris C57Bl/6. Les animaux du premier article faisaient partie d'une étude parallèle réalisée par un collègue qui visait à évaluer les déformations introduites entre l'IRM *in vivo*, l'IRM *ex vivo* et par le processus d'histologie sérielle (Castonguay et al., 2016, 2018). Les souris utilisées pour le second article font partie d'une autre étude multimodale de l'effet de l'augmentation de la pulsatilité artérielle induite par injection de chlorure de calcium sur la matière blanche. Tous les animaux et cerveaux ont été préparés selon un protocole publié par (Ragan et al., 2012) qui a été adapté afin d'imager les échantillons fixés à l'IRM avant les acquisitions histologiques.

Les animaux ont été anesthésiés avec 2-3% d'isoflurane et perfusés par voie transcardiaque avec 20 ml de tampon phosphate salin (PBS), puis avec un mélange de 4% de paraformaldehyde (PFA) et 1% de gadolinium (Gadovist). Le gadolinium sert à réduire le temps de relaxation T1 et ainsi accélérer les acquisitions IRM. Chaque tête de souris a été séparée de son corps et le crâne a été nettoyé pour enlever les muscles, la mâchoire inférieure, les vertèbres et les autres tissus (Figure 3.6A). Le crâne a ensuite été imagé dans de la fomblin avec une séquence d'imagerie par résonance magnétique à haute résolution angulaire (HARDI). La fomblin est un fluoropolymère inerte servant à éliminer le signal de fond de l'IRM tout en conservant une susceptibilité magnétique similaire au tissu (Shatil et al., 2016). Après une acquisition IRMd, le cerveau a été extrait de son crâne et a été intégré dans un bloc cylindrique d'agarose à 4% pour l'imagerie histologique. Le gel d'agarose a été oxydé pour créer des liaisons covalentes entre le milieu d'inclusion et le tissu cérébral, évitant ainsi la séparation des tissus pendant l'acquisition SOCT. Un inconvénient de la procédure d'oxydation est qu'elle rend l'agarose friable, ce qui peut provoquer des dommages lors du tranchage avec le vibratome. Pour éviter cet effet, les blocs cylindriques d'agarose oxydés à 4% ont été imbriqués dans de plus grands cylindres d'agarose non oxydés qui ont fourni un meilleur support structural. Entre les étapes de préparation des tissus et les séances d'imagerie, les échantillons ont été conservés dans du PFA à 4% et à 4°C.

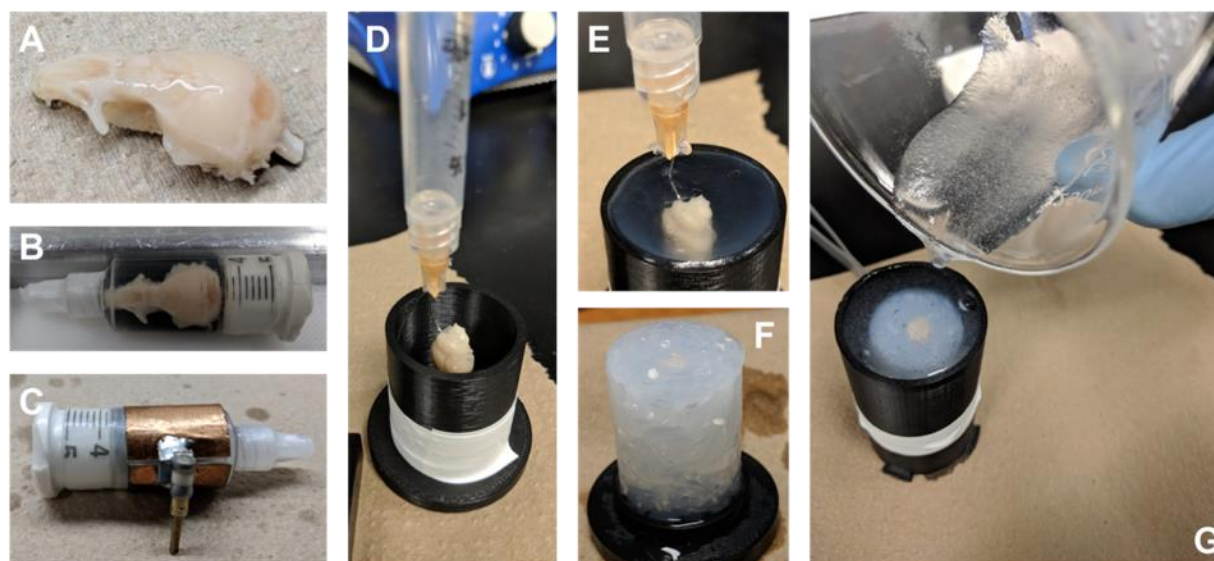


Figure 3.6 Préparation des tissus. (A) Crâne de souris nettoyé, (B) Crâne de souris dans le support à échantillon pour l'IRM, (C) Antenne IRM, (D) Positionnement d'un cerveau pour le bloque d'agarose, (E) Solidification de l'agarose, (F) Agarose oxydé et (G) Imbrication de l'agarose oxydé dans un bloc d'agarose non-oxydé.

### 3.2.2 Acquisition

Les acquisitions avec le système d'histologie sérielle 2R-SOCT sont contrôlées avec une interface web développée à partir d'un notebook *Jupyter* (Figure 3.7). Ceci permet de documenter les séances d'imagerie, de calibrer le système avant d'entreprendre l'acquisition automatique et d'interagir avec le mesurage et les contrôleurs de la plateforme en cours d'expérience. Une session type d'acquisition avec le 2R-SOCT peut être séparée en deux parties : la calibration et l'acquisition automatisée. Une acquisition automatique en utilisant uniquement l'OCT 3X dure environ 6 heures pour un cerveau de souris. Une acquisition automatique pour laquelle les ROIs 40X sont choisies aléatoirement pendant le mesurage dure environ 24 heures, tandis que si les ROIs sont sélectionnés manuellement à l'aide d'une interface graphique l'acquisition dure entre 2 et 3 jours selon le nombre de ROIs. Une acquisition SOCT 3X génère environ 200 GO de données brutes, alors qu'une acquisition 2R-SOCT en génère environ 1 TO par cerveau de souris. Les données 40X brutes sont enregistrées directement sur disque pour réduire les temps d'imagerie, et les données 3X et 40X sont assemblées après la session d'acquisition de données sur un serveur dédié de reconstruction.



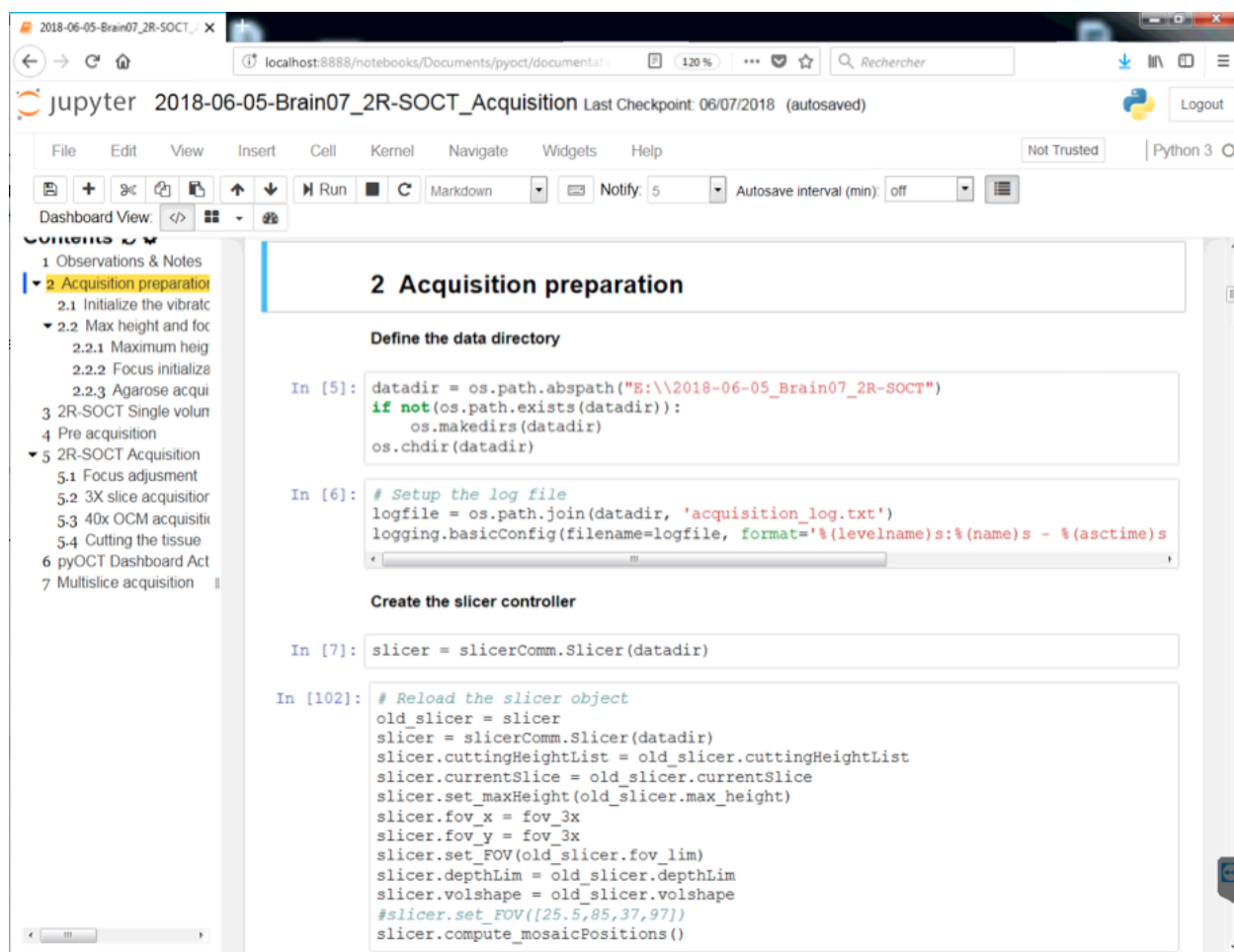


Figure 3.7 Serveur Jupyter Notebook servant à contrôler et documenter les séances d'acquisition 2R-SOCT.

### Calibration

D'abord, les paramètres des mesures sont définis (p.ex. taille et résolution des volumes 3X OCT, l'endroit où enregistrer les données, la profondeur de champ à conserver, etc). Les contrôleurs Python pour les composants du microscope sont initialisés et le système est calibré. La calibration permet de repérer la position approximative du tissu, de définir une hauteur maximale pour les déplacements afin d'éviter d'endommager l'échantillon, d'initialiser des hauteurs de coupes, de détecter la profondeur du plan focal dans les tissus et de repérer le tissu pour définir la région à imager par mosaïque avec l'OCT 3X.

Pour détecter le cerveau, une grande région autour du centre du support à échantillon est acquise à basse résolution avec l'objectif 3X. La mosaïque acquise est assemblée, et un algorithme de segmentation des tissus sépare l'image acquise en 3 régions : eau, agarose et tissu. Tous les pixels

de l'image classifiés dans la catégorie tissu sont ensuite utilisés pour définir un champ de vue rectangulaire qui est partitionné en images de taille 5x5 mm avec un recoupement de 20% entre chaque image voisine. Une marge de 1 mm est ajoutée autour de la mosaïque pour s'assurer que tout le tissu sera couvert au cours de l'acquisition. Cette mosaïque peut aussi être définie manuellement en ajustant la position des moteurs linéaires du support à échantillon et en utilisant l'OCT 3X pour observer en temps réel des coupes transversales du tissu.

Le centre de la mosaïque est ensuite positionné sous l'objectif 3X et on procède à une détection de la position du plan focal dans le tissu. La hauteur du support à échantillon est ajustée manuellement avec le contrôleur de l'élévateur Z jusqu'à ce que l'interface eau/agarose apparaisse dans l'image en temps réel de l'OCT 3X. Une optimisation automatique permet de trouver la hauteur de l'échantillon pour laquelle le plan focal de l'OCT 3X coïncide avec l'interface eau/tissu. Cette détection du plan focal emploie une méthode de Fibonacci pour repérer la hauteur correspondant à un volume OCT dont l'intensité moyenne est la plus élevée.

La hauteur de coupe est initialisée en déplaçant l'échantillon près du vibratome et en ajustant manuellement la hauteur du support jusqu'à ce que la lame soit entre 0.5-1mm sous la surface de l'agarose. Une première coupe est réalisée à cette position. Ensuite, quelques coupes de 0.5 mm sont réalisées automatiquement pour atteindre le tissu. En général, les coupes d'initialisation sont répétées pour atteindre le cervelet des souris. Une dernière coupe de 0.2mm est faite pour s'assurer que le vibratome fonctionne correctement pour cette épaisseur de tranchage et l'échantillon est remplacé automatiquement sous l'objectif 3X.

#### Acquisition automatisée

Quelques fonctions, utilisant les contrôleurs Python de la plateforme d'histologie, sont utilisées dans l'interface web Jupyter. Elles permettent de :

1. Optimiser la position du focus 3X dans l'échantillon
2. Acquérir et assembler une mosaïque 3X du cerveau
3. Trancher le tissu avec le vibratome (pour une épaisseur de coupe par défaut de 0.2mm)
4. Générer et acquérir des ROIs 40X pour la dernière tranche de cerveau mesuré
5. Importer et acquérir une liste de ROIs 40X. Dans ce cas, les ROIs sont définies pour la dernière tranche de cerveau mesurée à l'aide d'une interface graphique

6. Acquérir de façon séquentielle plusieurs mosaïques 3X sans procéder à une mesure de ROI 40X, ou en générant automatiquement N mosaïques 40X à acquérir à chaque M tranches de tissus

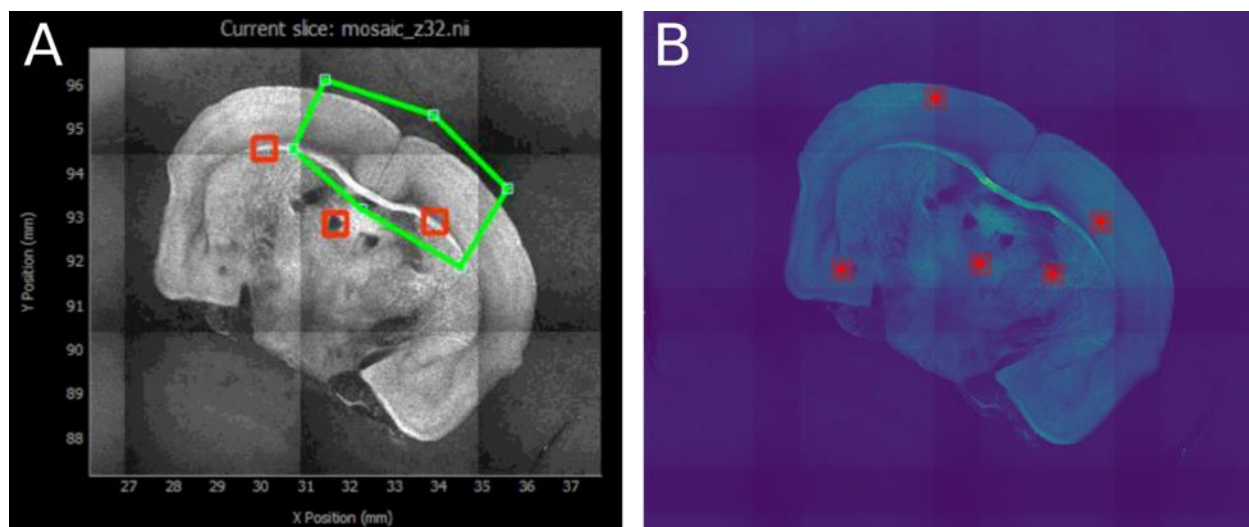


Figure 3.8 Sélections manuelle (A) et automatique (B) des ROIs 40X pour une tranche de cerveau de souris. (Rouge) ROIs de type OCM, (Vert) ROI de type mosaïque.

La méthode de sélection automatique des ROIs 40X est décrite en détail dans l'article 2 présenté au Chapitre 5. Brièvement, l'algorithme segmente d'abord le tissu, puis calcule une carte d'intérêt à partir de l'amplitude du gradient 2D dans l'image. Cette carte d'intérêt sert à guider la sélection aléatoire des ROIs vers des structures présentant de grandes variations de contraste (p. ex. des amas de fibres).

Toutes les données acquises avec la plateforme 2R-SOCT sont enregistrées sous format Nifti. Ce format a été choisi, car on peut écrire des informations supplémentaires dans les fichiers en plus des données, telles que la résolution de l'image et la position des moteurs du support à échantillon. C'est aussi un format de données fréquemment utilisé en neuro-imagerie. La position au sein de la mosaïque 3X est également contenue dans le nom de fichier de chaque volume OCT. À la fin d'une séance d'imagerie, les données sont transférées par FTP à un des deux serveurs de stockage formés de 45 disques durs de 3TO configurés en RAID6. Ce choix de redondance tolère la perte de jusqu'à deux disques par serveur sans perdre les données. Pour éviter les longs temps de transfert pour les grands jeux de données, il est également possible de retirer le disque dur utilisé pour l'acquisition et de le placer dans le serveur de reconstruction, les deux ordinateurs étant munis de changeurs de disque rapides.

### 3.2.3 Reconstruction des données

La reconstruction des données d'histologie sérielle nécessite trois étapes principales : la coregistration XY des images, l'assemblage des volumes pour chaque tranche de tissu, puis l'assemblage des tranches en un seul volume. Le code de reconstruction a été développé pour pouvoir être utilisé avec plusieurs modalités d'imagerie optique (OCT, microscopie confocale, microscopie 2-photons), car plusieurs trancheurs au sein du laboratoire étaient en fonction ou en cours de développement au début de cette thèse. De plus, la méthode peut reconstruire des jeux de données mêmes si la position des images n'a pas été enregistrée en cours d'acquisition. Seule l'information sur la position dans la mosaïque est nécessaire. Cette information est incluse dans le nom du fichier.

#### Coregistration XY

Chaque volume doit être recalé avec ses voisins afin de connaître leur position exacte dans le référentiel du trancheur. Plusieurs métriques de similitude peuvent être utilisées pour déterminer la ressemblance des volumes voisins et pour trouver le décalage entre eux : p.ex. la corrélation de phase (Foroosh et al., 2002; Preibisch et al., 2008), la corrélation croisée normalisée (Rankov et al., 2005) ou l'information mutuelle (Avants, Tustison, Song, et al., 2011). La corrélation de phase a été sélectionnée, car elle permet d'obtenir la meilleure translation entre les images sans avoir à procéder à une optimisation des paramètres de transformation. Les moteurs du support à échantillon sont précis au micron près. On peut donc utiliser un modèle de déplacement des moteurs pour estimer la position de chaque volume mesuré, et cela, en fonction de quelques paramètres d'acquisition : soit l'angle  $\phi$  entre les moteurs X et Y du support à échantillon, l'angle  $\theta$  entre le plan de balayage du laser et le référentiel défini par les moteurs du support, la fraction du recoupement en X et Y entre les volumes adjacents ( $O_x$  et  $O_y$ ) et la taille des volumes acquis ( $n_x$ ,  $n_y$ ). La position des moteurs est alors donnée par :

$$\vec{D}(i, j) = \mathbf{R}(\theta)[p_x \mathbf{I} + p_y \mathbf{R}(-\phi)][1, 0]^T \quad (3.1)$$

où  $\mathbf{I}$  est la matrice identité,  $\mathbf{R}(x)$  est la matrice de rotation 2D, et les indices  $p_x(i) = n_x(1 - O_x)i$  et  $p_y(j) = n_y(1 - O_y)j$  varient en fonction de la position  $(i, j)$  de l'image au sein de la mosaïque. Pour estimer les paramètres du modèle à partir des données, on détermine d'abord quels volumes contiennent du tissu en comparant l'histogramme des intensités de chaque image avec celui d'une

image ne contenant que de l'agarose. Puis, on parcourt tous les volumes d'une tranche en un seul passage. Chaque image partageant un voisinage commun est coregistrée avec sa voisine en utilisant la corrélation de phase. Lorsque les positions optimales sont calculées pour tous les volumes de tissu, les paramètres d'acquisition du trancheur sont estimés. Les positions qui sont calculées par la suite à l'aide de ce modèle sont suffisamment précises pour s'affranchir d'une seconde étape d'optimisation lorsqu'on utilise des données issues de l'objectif 3X. Le modèle de déplacement des supports linéaires présume que les moteurs ne sont pas parfaitement orthogonaux et que les déplacements selon chaque axe peuvent être mal calibrés. Il considère toutefois que les données sont distribuées en mosaïque et que du tissu est présent dans les données. Ce modèle est décrit en de plus amples détails au chapitre suivant.

Le calcul des positions de chaque image a été nécessaire uniquement pour les données acquises avec la première version du système OCT sériel, car les positions de mesure n'étaient pas enregistrées en cours d'acquisition. Pour l'OCT bi-résolution, la position cartésienne des moteurs linéaires XY était notée pour chaque image. Puisque la précision de positionnement de ces composants mécaniques est d'ordre micrométrique, la coregistration XY des images au sein d'une tranche n'a pas été nécessaire. Il a toutefois été nécessaire de créer un modèle permettant de convertir la position en micro-pas des supports linéaires en positions cartésiennes. Pour le deuxième article, le modèle présenté à l'équation 3.1 a été simplifié par :

$$\vec{p} = \mathbf{A} \vec{p}_M + \vec{b} \quad (3.2)$$

où  $\mathbf{A}$  est une matrice de transformation de taille  $2 \times 2$ ,  $\vec{b}$  est un vecteur de translation,  $\vec{p}$  est la position 2D cartésienne et  $\vec{p}_M$  est la position des moteurs linéaires en micro-pas. Le modèle a été simplifié pour faciliter l'estimation de la matrice de transfert. Celle-ci a été calculée à l'aide d'une séquence de calibration qui déplaçait un échantillon d'un nombre prédéfini de micro-pas, et qui mesurait une image avant et après le déplacement (Figure 3.9). La translation cartésienne entre les images a été calculée par corrélation de phase. Ce déplacement a été répété plusieurs fois, avec différents nombres de pas et différents vecteurs de déplacement. Finalement, le modèle a été inversé pour estimer les valeurs de la matrice de transformation. Le vecteur  $\vec{b}$  a été ajouté pour considérer la position correspondant à l'origine pour le système de support linéaire. Ce modèle a été utilisé durant les acquisitions 2R-SOCT, de sorte que les mosaïques étaient définies selon leur position cartésienne et non selon leur position en micropas utilisés pour le SOCT.

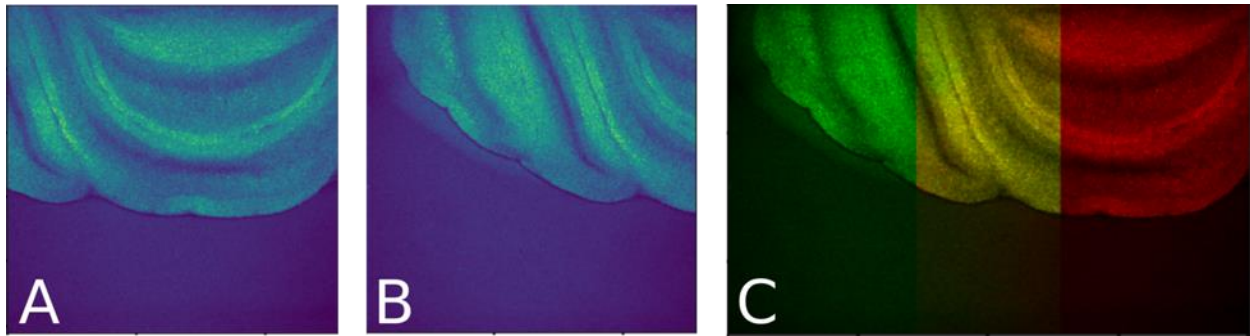


Figure 3.9 Exemples de coregistration utilisée pour calibrer les moteurs du support à échantillon. (A) Image initiale, (B) Image après un déplacement d'environ 2mm vers la gauche, (C) images alignées par corrélation de phase.

### Assemblage XY

Une fois les positions 2D (XY) calculées pour tous les volumes, ceux-ci sont recollés tranche par tranche. Pour ce faire, lorsque l'image à ajouter à la mosaïque partage une région commune avec les données déjà incluses dans la mosaïque en cours de reconstruction, le masque de leur région de recoupement est mesuré. Ce masque est ensuite utilisé pour calculer des poids de mélange  $\alpha(x, y)$  en résolvant numériquement l'équation de Laplace  $\nabla^2 \alpha(x, y) = 0$ . La solution considère une condition de frontière déterminée par des opérations morphologiques sur les masques de la mosaïque et de l'image à ajouter. Cette méthode est décrite en détail dans l'article 1. Les poids de mélange sont utilisés pour ajouter les volumes à la mosaïque selon :

$$M'(x, y) = \alpha(x, y)I(x, y) + (1 - \alpha(x, y))M(x, y) \quad (3.3)$$

où  $I(x, y)$ ,  $M(x, y)$  et  $M'(x, y)$  sont l'image à ajouter, la région correspondante dans la mosaïque et la mosaïque modifiée respectivement. Ce mélange par poids issus de l'équation de diffusion a pour avantage que les conditions de frontières entre toutes les images sont lissées et donc qu'il n'y a pas de transitions brusques entre chaque région de la mosaïque. De plus, la méthode est adaptée aux calculs 2D et 3D des poids de mélange.

### Assemblage des volumes en Z

Quelques étapes de prétraitement sont faites sur les tranches XY assemblées avant de les joindre en un seul volume. D'abord, la PSF confocale du microscope 3X est extraite des volumes d'agarose en régressant le profil axial de l'intensité d'un faisceau gaussien dans un milieu homogène

(Équation 2.19) sur le profil moyen de la réflectivité dans l'agarose. Ensuite, un modèle de l'atténuation du signal avec la profondeur dans le tissu est utilisé pour estimer cette propriété optique (Équation 2.18). Cette carte d'atténuation résolue spatialement  $\hat{\mu}(x, y, z)$  est utilisée pour retirer la variation du signal OCT avec la profondeur.

$$I'(x, y, z) = \frac{I(x, y, z)}{\exp\left[-2 \int_0^z \hat{\mu}(x, y, z) dz\right]} \quad (3.4)$$

Le tissu est segmenté en 3D afin de détecter l'interface eau/tissu. Ceci est nécessaire, car la majorité des volumes OCT contient une portion d'eau au-dessus du tissu et cette région doit être retirée lors de l'assemblage. Les segmentations pour chaque tranche de tissu sont combinées et leur recouvrement est optimisé pour être au plus de 50 microns. La translation axiale entre chaque tranche de tissu est estimée par un algorithme de recherche exhaustive employant la corrélation entre les gradients 2D dans chaque tranche. Finalement, l'intersection des segmentations du tissu entre chaque tranche est utilisée pour calculer des poids de mélange en résolvant l'équation de Laplace en 3D et chaque volume est assemblé.

### 3.3 IRM de diffusion

Tous les cerveaux *ex vivo* de souris ont été imagés avant l'histologie sérielle avec une séquence d'IRM de diffusion à grande résolution angulaire (HARDI) et à plusieurs couches. Les mesures ont été obtenues par une séquence standard de spin écho 3D (P. W. Jones, 1999). Le scanner employé était un Agilent 7 Tesla équipé de gradients de 600 mT/m et contrôlé par le logiciel VnmrJ. L'antenne était formée d'une seule boucle de forme cylindrique (Figure 3.10A). L'échantillon (crâne de souris) était placé dans une seringue étanche remplie de fomblin et dégazée avec une chambre à vide pour retirer les bulles d'air. Cette seringue était ensuite fixée dans un porte-échantillon conçu pour pouvoir positionner le cerveau au centre de la machine IRM. L'axe antérieur postérieur du cerveau était orienté perpendiculairement à l'axe long de l'IRM. Des séquences sonde (*scout*) ont ensuite été utilisées pour repérer l'échantillon et pour définir la position du FOV à imager. La taille du FOV était de 16 x 12 x 8 mm, et le FOV était séparé en voxel isotropique de 125 microns. Le champ a été uniformisé (*shimming*), puis une séquence d'acquisition HARDI à plusieurs couches était initiée. Elle consistait en 70 angles de gradient séparés en 3 couches, en sus de 7 acquisitions avec un gradient nul réparties uniformément au



cours de l'expérience. Le choix des angles et des couches a été fait à l'aide d'une méthode de répulsion électrostatique sur plusieurs couches (Caruyer et al., 2013). Une acquisition durait environ 48h. Suite à la session d'imagerie, le crâne était retiré de la fomblin, et le cerveau était extrait du crâne (Spijker, 2011; Sultan, 2013). L'organe était finalement conservé dans du PFA (4%) à 4°C.

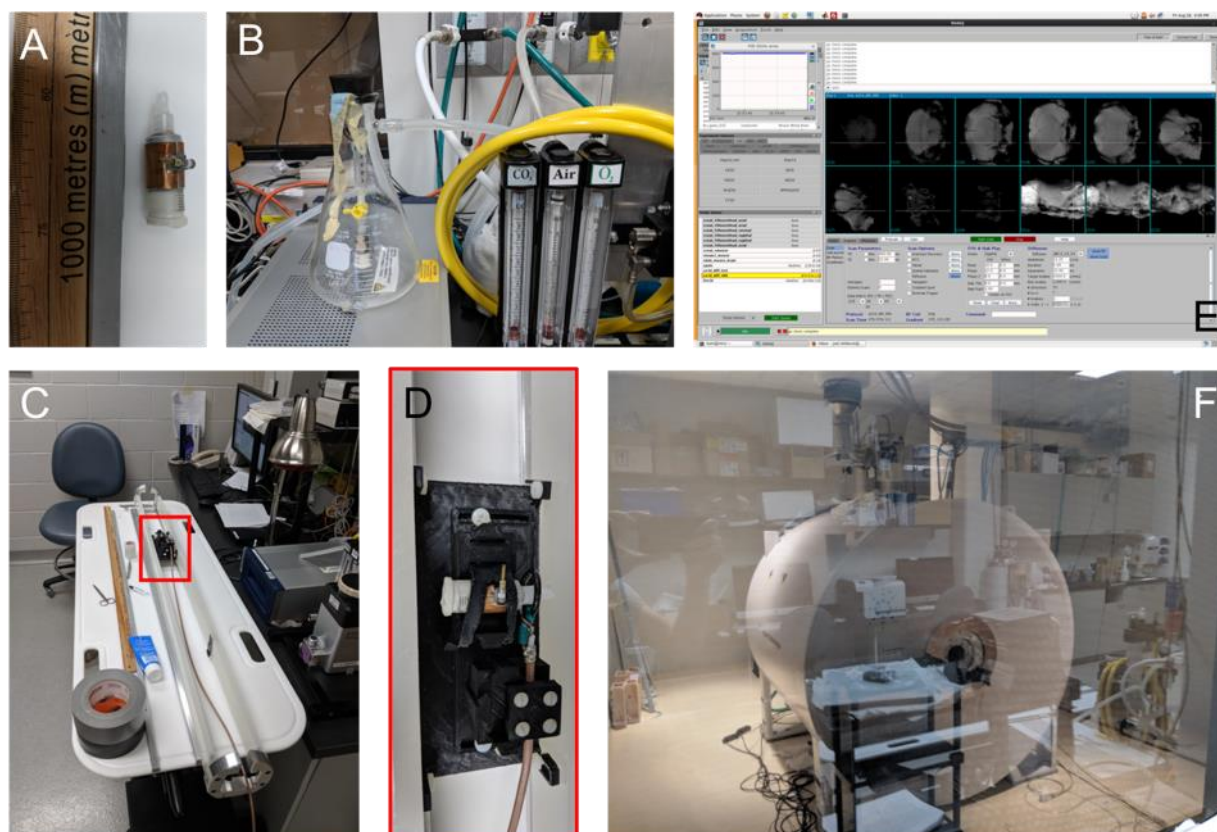


Figure 3.10 Étapes d'une acquisition IRM. (A) Échantillon placé dans une seringue étanche et antenne (B) Dégazage de la fomblin, (C) porte-échantillon, (D) agrandissement du porte-échantillon contenant la seringue étanche, (E) Interface de contrôle VnmrJ et d'une séquence de sonde pour repérer le crâne de souris, (F) Machine IRM 7T.

Le prétraitement des données IRMd comprend plusieurs étapes. D'abord, tous les cerveaux ont été alignés sur un cerveau de référence afin de suivre la convention d'orientation neurologique. Un cerveau moyen publié par le centre d'imagerie des souris de l'université de Toronto a été utilisé pour cette tâche (Dorr et al., 2008). Les cerveaux ont ensuite été segmentés afin de retirer le crâne des données avec une technique employant l'outil ANTs (Avants, 2017). La technique combine la création d'une carte de probabilité de présence de cerveau, une segmentation des tissus en plusieurs



classes et des étapes de coregistration déformables. Suite à l'alignement des données et à la segmentation des cerveaux, plusieurs étapes de débruitage des données ont été employées. Celles-ci consistaient en une réduction des courants Eddy et des mouvements de l'échantillon, en une correction des inhomogénéités de champ, en une réduction du bruit Ricien par moyennage non local et par la correction des variations temporelles du signal de fond au cours de l'expérience IRM.

Les données IRM<sub>d</sub> débruitées ont été analysées avec 3 modèles. Le premier modèle est pour l'analyse des tenseurs de diffusion (DTI), le second est pour la reconstruction du signal HARDI et l'extraction des distributions d'orientation des fibres (fODF). Le dernier modèle est NODDI (Zhang et al., 2012), et il est utilisé pour calculer la dispersion d'orientation des neurites et de la fraction volumique de l'eau intracellulaire. Pour les modèles DTI et HARDI, les outils d'analyse *scilpy*<sup>3</sup> développés à l'université de Sherbrooke par le groupe du Pr Maxime Descoteaux ont été employés (Dell'Acqua et al., 2013; Descoteaux et al., 2009). Pour le modèle NODDI, le module python AMICO<sup>4</sup> a été utilisé (Daducci et al., 2015).

### 3.4 Analyse multimodale

La comparaison multimodale entre les mesures OCT et IRM<sub>d</sub> a servi deux buts : mieux comprendre l'origine du signal OCT, et démontrer que le pipeline d'imagerie 2R-SOCT peut être utilisé pour valider ou compléter les mesures de neuro-imagerie pour des études de groupe avec des cerveaux de souris. Des opérations fréquemment utilisées en IRM ont été adaptées pour les données d'histologie sérielle, soient la création d'un cerveau moyen à partir de plusieurs volumes provenant de différents individus (Avants et al., 2010), l'alignement des données sur un atlas de référence (Avants et al., 2008), la segmentation des tissus en plusieurs classes (Avants, Tustison, Wu, et al., 2011), et la coregistration multimodale. Ceci permet d'être en mesure de comparer l'IRM<sub>d</sub> avec l'OCT (Kuan et al., 2015).

La plupart des techniques utilisées pour les analyses multimodales et multisujets requièrent l'alignement d'images provenant de plusieurs sources ou de plusieurs sujets. Le recalage d'image est un thème classique dans le domaine du traitement d'image. Les algorithmes de recalage peuvent être séparés en trois parties distinctes : un modèle de transformation des données, une méthode

---

<sup>3</sup> <https://bitbucket.org/account/user/sciludes/projects/SCILPY>

<sup>4</sup> <https://github.com/daducci/AMICO>

pour comparer l'image transformée avec une image de référence, et les techniques d'optimisation utilisés pour trouver les transformations optimales pour recaler deux images. Deux types de transformations sont considérées lors du recalage : les transformations linéaires globales et les transformations locales non linéaires. Les transformations linéaires (Translation, rotation, homothétie, affine, projective...) peuvent être représentées sous forme matricielle par :  $T(x) = Bx + u$ , où  $B$  est une matrice de transformation,  $x$  est la position d'un pixel dans l'image et  $u$  est une translation. Quelques exemples de transformations linéaires 2D sont représentés à la figure suivante. En plus du modèle de transformation, le recalage nécessite une technique d'interpolation, qui peut varier en complexité, allant par exemple de l'interpolation par plus proche voisin à l'interpolation par B-spline.

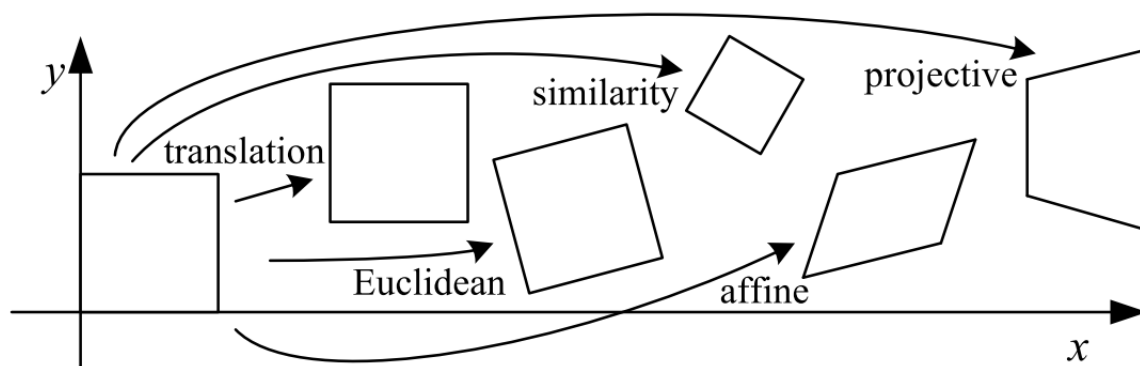


Figure 3.11 Transformations linéaires 2D. Reproduction de la figure 2 de l'article (Szeliski, 2006)

Une seconde partie essentielle aux techniques de recalage est l'évaluation de la similarité entre paires d'images. Plusieurs mesures de similarités existent. Les mesures utilisent l'intensité dans l'image pour quantifier la similarité. Quelques mesures iconiques sont la somme des différences absolues, la somme des différences au carré, la corrélation croisée, ou l'information mutuelle. Une autre approche est la similarité géométrique, c'est-à-dire qu'un ensemble de primitives sont détectées dans chaque image et la transformation optimale est évaluée en calculant la distance entre chaque paire de primitives correspondantes.

La variabilité intersujet et intermodale a pour conséquence que les transformations globales linéaires ne sont pas suffisantes pour représenter de façon précise dans un même référentiel les images du cerveau. Il faut donc utiliser en plus des transformations linéaires des méthodes

d'alignement non linéaire pour représenter dans un même référentiel des cerveaux issus de plusieurs individus. Dans une comparaison de 14 algorithmes de déformation non linéaires, (Klein et al., 2009) ont montré que les outils de ANTs (Avants et al., 2009) et la déformation difféomorphique symétrique (SyN, (Avants et al., 2008)) étaient parmi les techniques donnant les meilleurs résultats. Ce formalisme de registration a donc été utilisé pour aligner les données SOCT. Cet outil fait entre autre partie du module python Nipype servant à définir et exécuter des pipelines d'analyse en neuro-imagerie (Gorgolewski et al., 2011). Nipype a été utilisé puisqu'il peut s'intégrer facilement avec les algorithmes de reconstruction qui ont été développés pour le SOCT dans cette thèse. De plus (Kuan et al., 2015) du Allen Institute ont montré que pour effectuer des alignements multimodaux entre histologie et IRM, l'utilisation d'un cerveau moyen intermédiaire permettait d'obtenir de meilleurs résultats. Ainsi, la méthode d'alignement multimodale mise en place pour les données SOCT a d'abord calculé un cerveau de souris moyen OCT avec un algorithme de normalisation décrit par (Avants et al., 2010). Cet algorithme utilise ANTs et la méthode de déformation non linéaire SyN pour optimiser de façon itérative l'apparence et la forme d'un cerveau moyen. Le cerveau de souris moyen a été calculé pour une résolution réduite de 50 microns/pixel, et a utilisé 4 cerveaux OCT assemblés ainsi que leur version miroir lorsque réfléchi le long de l'axe médial. Le cerveau moyen a été aligné sur le cerveau de souris moyen du Allen Institute pour profiter de son atlas exhaustif des structures du cerveau (Lein et al., 2007). Pour les autres cerveaux acquis par SOCT, les données ont été d'abord alignées sur le cerveau moyen OCT, puis les matrices de transformation et les champs de déformation calculés pour faire correspondre les cerveaux moyens OCT et Allen ont été utilisés. Ainsi, chaque cerveau de souris SOCT a été représenté dans le référentiel de coordonnées commun du Allen Institute (Allen Institute, 2015). Des étapes d'alignement similaires ont été réalisées pour aligner les données IRMd dans le référentiel du Allen Institute. Dans ce cas, les cerveaux moyens intermédiaires étaient soit un cerveau moyen de l'anisotropie fractionnelle (Jiang & Johnson, 2010) pour le premier article ou des données pondérées selon le temps de relaxation spin-spin T2 (Dorr et al., 2008) pour le deuxième article. Pour faire correspondre les ROIs 40X acquis par le 2R-SOCT et les données IRMd, un volume d'étiquettes a été généré pour lequel des blocs de mêmes dimension et position ont été placés dans le cerveau de souris 3X. Les matrices et champs de déformation calculés lors de l'étape d'alignement multimodal ont ensuite été appliqués de façon séquentielle au volume d'étiquettes, de sorte qu'il a été placé dans le même référentiel que les données IRMd.

## CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : WHOLE MOUSE BRAIN IMAGING USING OCT: RECONSTRUCTION, NORMALIZATION, SEGMENTATION AND COREGISTRATION TO DIFFUSION MRI

Ce premier article est en lien avec le 1er et le 3e objectif de la thèse. Il présente la méthode de reconstruction des volumes SOCT en un seul cerveau. Les données utilisées pour cette publication ont été acquises par la première version du système d'histologie sérielle par OCT, c'est-à-dire le système à un seul bras développé par Alexandre Castonguay. Une méthode d'extraction et de compensation de l'atténuation optique avec la profondeur a été développée en se basant sur un modèle de diffusion à un seul photon. C'est également pour cette publication qu'ont d'abord été adaptées les techniques d'alignement multimodal des cerveaux de souris OCT sur des données IRMd et de création de cerveaux moyens. Finalement, une comparaison entre IRMd et OCT a été réalisée en utilisant un algorithme de segmentation des tissus issu de la littérature IRM. Cette comparaison a permis de mieux comprendre l'origine du contraste OCT dans la matière blanche. Cet article a été publié dans le journal *Neurophotonics* le 11 juillet 2017. Il s'agit d'une version améliorée et beaucoup plus détaillée du compte rendu (Joël Lefebvre, Castonguay, & Lesage, 2017b), qui a été le sujet d'une présentation orale lors de la conférence SPIE Photonics West – BIOS en février 2017. Une figure de cet article a été présentée en page couverture du journal *Neurophotonics* pour le volume 4 (4) et plusieurs images ont également été utilisées comme matériel promotionnel de la conférence SPIE Photonics West en 2018.

*Authors :* Joël Lefebvre<sup>1</sup>, Alexandre Castonguay<sup>1</sup>, Philippe Pouliot<sup>1,2</sup>, Maxime Descoteaux<sup>3</sup>, Frédéric Lesage<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Université de Sherbrooke, Sherbrooke Connectivity Imaging Laboratory, Sherbrooke, Québec, Canada

**Abstract.** An automated massive histology setup combined with an optical coherence tomography (OCT) microscope was used to image a total of  $n = 5$  whole mouse brains. Each acquisition generated a dataset of thousands of OCT volumetric tiles at a sampling resolution of  $4.9 \times 4.9 \times 6.5 \mu m$ . This paper describes techniques for reconstruction and segmentation of the sliced brains.

In addition to the measured OCT optical reflectivity, a single scattering photon model was used to compute the attenuation coefficients within each tissue slice. Average mouse brain templates were generated for both the OCT reflectivity and attenuation contrasts and were used with an  $n$ -tissue segmentation algorithm. To better understand the brain tissue OCT contrast origin, one of the mouse brains was acquired using dMRI and coregistered to its corresponding assembled brain. Our results indicate that the optical reflectivity in a fiber bundle varies with its orientation, its fiber density, and the number of fiber orientations it contains. The OCT mouse brain template generation and coregistration to dMRI data demonstrate the potential of this massive histology technique to pursue cross-sectional, multimodal, and multisubject investigations of small animal brains.

*Keywords:* massive histology; image reconstruction; optical coherence tomography; tissue segmentation; diffusion MRI; brain normalization

## 4.1 Introduction

Conventional histology is widely used to explore the microstructural properties of tissue samples or to validate macroscale measurements made with other imaging modalities such as MRI (Calamante et al., 2012). In spite of the versatility and maturity of this technique for identifying various biological tissue components, it can be labor intensive and difficult to implement when microscopic measurements over whole organs are required. For example, the BigBrain project required around 1000h of acquisition time alone to scan a whole human brain and each tissue slice had to be manually processed to fix defects introduced by the cutting process (Amunts et al., 2013). To address these technical limitations, an optical microscope can be combined with a motorized tissue slicing apparatus to automatize the acquisition process and thus cover large samples even with a limited field of view. Many imaging modalities can be used in such a way and are reported in the literature: scanning electron microscopy (Kremer et al., 2015), quantitative histopathology using block-face photography (Vandenberghe et al., 2016), multiphoton scanning microscopy (Oh et al., 2014b; Price et al., 2006; Ragan et al., 2012), CARS microscopy (Y. Fu et al., 2008), or polarization-sensitive optical coherence tomography (PS-OCT) (Magnain et al., 2014; H. Wang et al., 2015; H. Wang, Zhu, & Akkin, 2014; H. Wang, Zhu, Reuter, et al., 2014), to name a few. In this paper, optical coherence tomography (OCT) was combined with a vibratome and a motorized stage to measure the intrinsic brain tissue contrast. This setup possesses two advantages over conventional histology: (1) no prior staining is required and (2) multiple depth measurements can

be acquired simultaneously, thus allowing for *in situ* slicing, thicker tissue slices, and faster image acquisition times.

In Ref. (Leahy et al., 2013) it was shown that the OCT reflectivity contrast in brain tissue is mainly caused by myelinated fibers and, in a smaller proportion, to cell body densities within the tissue. This work further suggested that white matter fiber contrast depends on their orientation in relation to the direction of the microscope optical axis (MOA). The backscattering signal is higher when the fibers are orthogonal to the sampling beam rather than parallel to it. The tissue optical attenuation with depth introduces an additional spatially dependent contrast. In a review of optical properties of biological tissues (Jacques, 2013), it is reported that white brain matter exhibits larger scattering coefficients and anisotropy ratio than gray brain matter. Also, A-line signal attenuation was found to be a good indicator for differentiating white and gray matter in conventional OCT (H. Wang et al., 2011). Furthermore using a PS-OCT microscope combined with a vibratome, Liu et al. (Liu et al., 2016) showed that the signal attenuation was significantly different among the granular layer (GL), the molecular layer (ML), and the white matter fibers in *ex vivo* mouse cerebellum. Thus, the apparent attenuation coefficients may be used to segment the distribution of myelinated fibers within whole brains imaged with a massive histology setup using OCT as the imaging modality.

This paper describes the following. First, the tissue preparation and acquisition protocol are presented along with a description of an in-house automated high-throughput histology setup. Then, the reconstruction algorithms developed to assemble the thousands of OCT volumetric tiles into a single volume are summarized, followed by the method used to measure the apparent optical attenuation from the OCT A-lines reflectivity signal. Four mouse brains ( $n = 4$ ) were imaged using this technique and were coregistered to get a template of OCT reflectivity and attenuation contrasts at a downsampled isotropic resolution of  $50\ \mu m$  per voxel. Using these OCT brain templates, the individual brains were mapped to a common coordinate reference frame, which allowed direct comparisons of their contrasts. A tissue segmentation method that enabled the separation of myelinated axons from other cerebral tissue components was then applied on the OCT brains. The labels obtained from the OCT brain template tissue classification procedure were used as priors to segment a fifth reconstructed mouse brain. This fifth mouse brain was imaged using diffusion MRI before the automated histology acquisition, and the assembled brain was coregistered to the MRI data. Finally, the optical reflectivity and attenuation contrasts were compared with dMRI derived

metrics: fractional anisotropy (FA), maximal apparent fiber density (AFD\_max) (Raffelt et al., 2012), number of fibers orientations within a voxel (Dell’Acqua & Catani, 2012), and fiber bundle orientation. Note that this paper is an extended and revised version of a conference proceeding (Joël Lefebvre, Castonguay, & Lesage, 2017b) presented at the SPIE Photonics West-BiOS conference in February 2017.

Similar serial OCT scanners were reported previously in other publications to image rats (H. Wang et al., 2011; H. Wang, Zhu, & Akkin, 2014) and mice brains (Liu et al., 2016), as well as human brain samples (Magnain et al., 2014; H. Wang, Zhu, Reuter, et al., 2014). The novelty of our method lies in an improved depth-resolved signal attenuation model and the ability to create OCT brain templates using the advanced normalization tools (ANTs) (Avants, 2017). This paper contributes to understanding the OCT contrast mechanism within brain tissue using diffusion MRI metrics and multimodal image registration. The presented methodology could be used to pursue multimodal investigations with multiple subjects using serial optical coherence tomography scanners.

## 4.2 Methods

### 4.2.1 Tissue Preparation

The Animal Research Ethics Committee of the Montréal Heart Institute approved all surgical procedures in accordance with the Canadian Council on Animal Care recommendations. Five C57Bl/6 mouse brains were used for this study; the brains are part of another ongoing investigation. The tissue preparation procedure followed the methodology presented by Ragan et al (Ragan et al., 2012). Briefly, mice were anaesthetized under 2% isoflurane and perfused with 20 ml phosphate buffered saline and then by a mixture of 4% paraformaldehyde with 1% gadolinium. Each mouse brain was skull extracted and embedded in 4% agarose cylindrical blocks for serial imaging.

### 4.2.2 dMRI Acquisition

One of the brains was imaged *ex vivo* with a standard three-dimensional (3-D) spin echo diffusion MRI sequence (D. K. Jones et al., 1999), using an Agilent 7 Tesla scanner equipped with 600 mT/m gradients and a custom-built 1-loop cylindrical coil. Sequence parameters were: TE = 0.021 s, TR = 0.4 s, 30 gradient-encoding directions with  $b = 2079 \text{ s/mm}^2$  and five acquisitions with  $b = 0$ ,  $\delta = 5\text{ms}$ ,  $\Delta = 12 \text{ ms}$ , gradient amplitude = 320 mT/m, FOV =  $19.2 \times 12.8 \times 12.8 \text{ mm}$ , and an acquisition

matrix of  $128 \times 96 \times 96$  giving a resolution of  $150 \times 133 \times 133 \mu\text{m}$ , for a total acquisition time of 36 h. The diffusion MRI data preprocessing consisted of three steps: (1) correction of the field homogeneity artefacts (Tustison et al., 2010), (2) reduction of the Rician noise bias (Descoteaux et al., 2008), and (3) volume resampling to 0.133 mm isotropic resolution (Dyrby et al., 2014). Motion artefacts corrections were unnecessary due to the *ex vivo* nature of the sample. Then, in-house implementations (Dell’Acqua et al., 2013; Descoteaux et al., 2009) of diffusion tensor imaging and high angular resolution diffusion imaging reconstructions were performed using the Dipy library (Garyfallidis et al., 2014). The FA was computed from the local diffusion tensors with a non-negative least square method. The constrained spherical deconvolution of Dipy (Descoteaux et al., 2009; J-Donald Tournier et al., 2007) was used to reconstruct the fiber orientation distribution functions (fODF). The principal directions of diffusion in each voxel and the AFD\_max (Dell’Acqua & Catani, 2012; Raffelt et al., 2012) were extracted from the fODF. AFD\_max is the maximal value of the fODF on the sphere, and it can be interpreted as the maximum of the apparent fiber density (AFD). Finally, the number of fiber orientations (NuFO) within a voxel was computed with the method presented by (Dell’Acqua et al., 2013) and using a data-driven threshold set to 1.5 times the AFD\_max values in the ventricles. The purpose of this threshold in the ventricles was to remove noisy peaks of the fODF, which are simply high-frequency peaks with low fODF amplitude. The ventricles are used because NuFO should be 0 there.

### 4.2.3 SS-OCT and Image Acquisition

An in-house automated high-throughput histology setup combined with a swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) microscope was used to image the agarose embedded rodent brains (Figure 4.1). The SS-OCT system was reported in previous publications (Castonguay et al., 2015; Frédéric Lesage et al., 2015). The swept-source laser was operated at a central wavelength of  $\lambda_0 = 1310 \text{ nm}$  with a tuning bandwidth of  $\Delta\lambda = 100 \text{ nm}$  (Axsun, 1310 Swept Source Engine). A cropped Blackman apodization function was used to reduce the side lobes caused by the rectangular shape of the swept-source spectrum. The 3X microscope objective (Thorlabs, LSM04 Scan Lens) was enclosed in a 3-D printed watertight immersion chamber ending with a glass coverslip. This immersion chamber had two purposes: protect the scanning lens from the water and biological tissue debris created by the slicing process and impose a constant air/water column in the sample arm. The measured SS-OCT system resolutions in water were  $r_{x,y} = 8 \mu\text{m}$  laterally and



$r_z = 10 \mu\text{m}$  axially. Its sensitivity was 98.5 dB, and its sensitivity roll-off along depth was  $-0.01 \text{ dB}/\mu\text{m}$ .

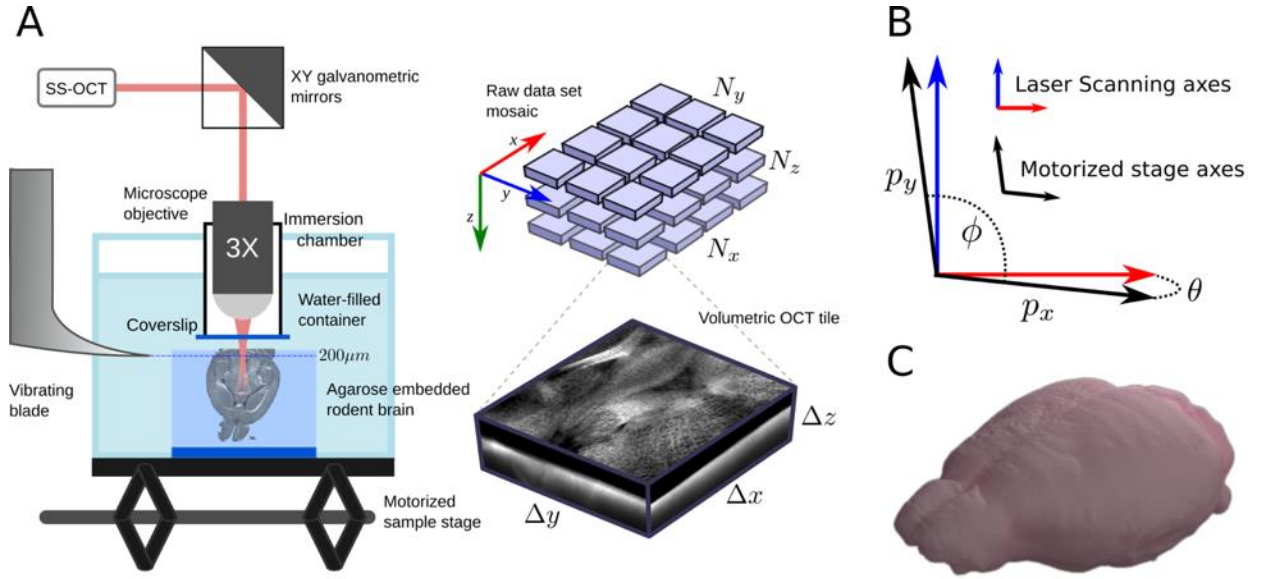


Figure 4.1 (a) Main components of the serial massive histology setup. (b) Parameters of the motor displacement model. (c) Volume rendering of a reconstructed brain (visualization made with the Blender software (Blender Online Community, 2016)).

Imaging was achieved by sequentially cutting thin tissue slices (around  $200 \mu\text{m}$ ) with a vibrating blade (Ragan et al., 2012) and by moving the sample under the microscope objective with a motorized stage (Zaber, T-LSR150B). At each motor position, the sampling beam was raster scanned over the objective's field of view using galvanometric mirrors. An OCT A-line was acquired for each sampling point, thus resulting in a mosaic of volumetric OCT tiles for each tissue slice. After a slice acquisition, the sample was moved axially using a motorized jack (Thorlabs, L490MZ/M), and this process was repeated until the whole tissue was sliced and imaged. Thousands of OCT volumetric tiles were acquired, each covering a size of  $\Delta x \times \Delta y \times \Delta z = 2.5 \times 2.5 \times 0.8 \text{ mm}^3$  with an anisotropic sampling resolution of  $4.9 \times 4.9 \times 6.5 \mu\text{m}^3$ . The volumes were assembled using the postprocessing reconstruction method presented in Sec. 4.2.4.

The SS-OCT full depth range was 5 mm, but only 0.8 mm A-lines were kept for the data reconstruction. This range spanned depths between 195 to 975  $\mu\text{m}$  from the zero-delay position of the OCT. This range usually comprises water and tissue. Indeed, due to variations in cutting depths, the water-tissue interface was typically located between 395 and 570  $\mu\text{m}$  from the zero-delay position. The upper and lower limits of the 0.8 mm depth range were chosen (1) to ensure that there

was an overlap between consecutive tissue slices, (2) to remove the auto-correlation artefacts and internal reflections due to the coverslip, (3) to remove the areas affected by complex ambiguity artefacts, and (4) to remove deeper sample areas where the signal was dominated by multiple scattered photons or by noise.

#### 4.2.4 Volume Reconstruction

The data reconstruction consisted of three steps: (1) tile registration, (2) XY slices stitching, and (3) Z slices stitching.

First, a displacement model of the motorized sample stage was used to estimate each tile position within the mosaic. The displacement parameters used were the tile overlaps  $(O_x, O_y)$ , the angle  $\phi$  between the  $X$  and  $Y$  motor axes, and the angle  $\theta$  between the laser scanning reference frame and the motorized stage reference frame [Figure 4.1(b)]. Given a tile at the grid position  $(i, j)$  within the mosaic, its associated motor position  $\vec{D}(i, j)$  was given by

$$\vec{D}(i, j) = \mathbf{R}(\theta)[p_x \mathbf{I} + p_y \mathbf{R}(-\phi)][1, 0]^T \quad (4.1)$$

where  $\mathbf{I}$  is the identity matrix,  $\mathbf{R}(X)$  is the two-dimensional (2-D) rotation matrix,  $(n_x, n_y)$  designates the tile shape, and

$$p_x(i) = n_x(1 - O_x)i, \quad p_y(i) = n_y(1 - O_y)j \quad (4.2)$$

are the cumulative horizontal and vertical motor displacements, respectively, necessary to move the stage to the mosaic tile  $(i, j)$ . To estimate the displacement model parameters from the data, the translations  $(d_x, d_y)$  between adjacent tiles within a single tissue slice were estimated using a phase-correlation-based pairwise registration method (Preibisch et al., 2008). Then, by distinguishing between the average vertical displacements  $(dx_j, dy_j)$  from tiles  $(i, j) \rightarrow (i, j + 1)$  and the average horizontal displacements  $(dx_i, dy_i)$  from tiles  $(i, j) \rightarrow (i + 1, j)$ , the model parameters were estimated using

$$\hat{\theta} = \arctan\left(-\frac{dy_i}{dx_i}\right) \quad (4.3)$$

$$\hat{\phi} = \arctan\left(\frac{dy_j}{dx_j}\right) + \hat{\theta} \quad (4.4)$$

$$\hat{\theta}_x = \begin{cases} 1 - \frac{dx_i}{n_x}, & \text{if } \hat{\theta} = 0 \\ 1 + \frac{dy_i}{n_x \sin(\hat{\theta})}, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (4.5)$$

$$\hat{\theta}_y = \frac{1 - dy_j}{n_y \sin(\hat{\phi} - \hat{\theta})} \quad (4.6)$$

Finally, the displacement model described by the extracted parameters  $(\hat{\theta}, \hat{\phi}, \hat{\theta}_x, \hat{\theta}_y)$  was used to compute the XY tile positions for each tissue slice. The advantages of using this model instead of directly computing the tile positions via image registration are that it is more robust to noise and it gives accurate position at multiple resolutions even when there is missing information. Moreover, it takes advantage of the motors' high displacement resolution ( $< 1 \mu\text{m}$ ).

The OCT volumes were then stitched within each tissue slice using weighted average linear blending over neighboring tiles overlap areas

$$M'(x, y) = \alpha(x, y)I(x, y) + [1 - \alpha(x, y)]M(x, y) \quad (4.7)$$

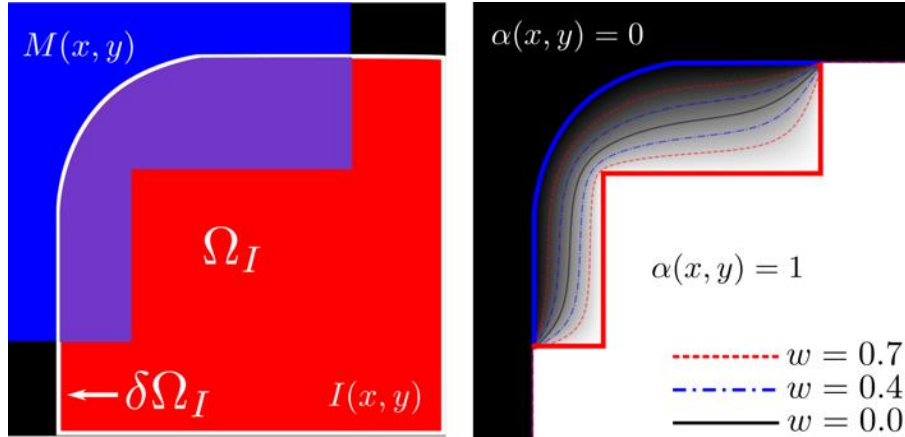
where  $M(x, y)$  is the mosaic,  $I(x, y)$  is a tile, and  $\alpha(x, y)$  is the spatially varying blending weights (Figure 4.2). These were obtained by solving the Laplace equation  $\nabla^2 \alpha(x, y) = 0$  over the overlap area with the boundary condition

$$\delta\alpha(x, y) = \begin{cases} 1, & \text{if } (x, y) \in \Omega_I \setminus \delta\Omega_I \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (4.8)$$

where  $\nabla^2$  is the Laplace operator,  $\delta\alpha(x, y)$  is the boundary of the overlap area,  $\Omega_I$  stands for the domain of tile I, and  $\delta\Omega_I$  is its boundary. In other words,  $\delta\alpha(x, y)$  is null except when the overlap area boundary lies within the tile I, in which case  $\delta\alpha(x, y) = 1$ . The Laplace equation was solved using the 5-stencil (in 2-D) or 7-stencil (in 3-D) finite difference approaches with a Jacobi iteration scheme (LeVeque, 2007). The blending weights  $\alpha(x, y)$  given by the diffusion equation ensured a smooth transition between neighboring tiles. Also, the equation above can be solved in 2-D/3-D and for complex overlap geometries. Indeed, the Laplace formulation does not rely on an overlap geometry; it only depends on the boundary condition. For example, when stitching tissue slices together to get a 3-D volume, the overlap geometries between adjacent slices were constrained by data masks to remove tissue slicing defects. An additional parameter  $w \in [0, 1]$  was used to modify the blending width within the overlap area, thus resulting in the modified blending weights  $\alpha'(x, y)$

$$\alpha'(x, y) = \begin{cases} 0, & \text{if } \alpha(x, y) < \frac{w}{2} \\ 1, & \text{if } \alpha(x, y) > 1 - \frac{w}{2} \\ \frac{\alpha(x, y) - \frac{w}{2}}{1 - w} & \text{otherwise} \end{cases} \quad (4.9)$$

The parameter  $w$  was used to control the blending seams visibility. When  $w = 0$ , there is no transition between the mosaic and the new tile. The extent of the blending area increases as  $w$  becomes larger. When  $w = 1$ , the blending is done over the whole overlap area. In other words,  $w$  controls the steepness of the blending. A value of  $w = 0.3$  was used for the reconstruction presented in this study. Image blending acts as a spatial compounding that reduces the speckle noise in the overlap areas only. This results in a grid-shaped artifact in the reconstructed slices as no denoising occurs inside the tiles. Using the modified blending weights  $\alpha'(x, y)$ , the spatial extent of the grid-shaped artifact was reduced.



*Figure 4.2 Laplace blending example. (a) A tile  $I(x, y)$  (red) is added to the mosaic  $M(x, y)$  (blue). The Laplace equation is solved over the overlap area (violet). (b) Laplace blending weights solved for this geometry. The contour lines traced inside the overlap area indicate the extent of the modified blending weights for different values of the blending width parameter  $w$ .*

The last data reconstruction step was to stitch the tissue slices together to get a complete 3-D volume. The depth translations between consecutive tissue slices were computed as follows. First, the whole OCT reflectivity tissue slices were smoothed using a 2-D XY Gaussian kernel of standard deviation  $k = 25 \mu m$ . Then, the image structure boundaries within each mosaic were enhanced by computing the normalized 2-D XY image gradient magnitude. Using the normalized gradient maps, the cross correlation between each depth position of the  $n'$ th+1 slice and the last depth position of the  $n'$ th slice were computed. The depth associated with the maximum image

gradient cross correlation was selected as the optimal translation between the  $n$ 'th and  $n$ 'th + 1 slices. This procedure was repeated for all adjacent slices.

The use of the image gradient for this registration process was motivated by the OCT depth-dependent signal attenuation. Indeed, the tissue contrast at the bottom of a slice is attenuated by all the structures encountered by the sampling beam. These scattering structures are removed by the slicing process, which increases the signal measured at corresponding positions in the next slice. When using the OCT reflectivity to compute the depth translation between slices, the algorithm tended to align the top tissue layers together as they exhibited similar contrasts solely due to the fact that they are not affected by signal attenuation. Instead, the normalized image gradient modulus delineates the brain and fiber tracts boundaries and is not affected by signal attenuation.

Another aspect that needs to be considered when stitching the tissue slices together is the roughness and denivelation of the water/tissue interface: the slicing process does not always result in a clear cut and the tissue deformations can introduce holes in the reconstructed data. This is taken into consideration by detecting the water/tissue interface depth for each A-line and creating a data mask to keep only the pixel under the interface in the assembled volume. Finally, the tissue slices were stitched together using the 3-D blending weights given by solving the Laplace equation  $\nabla^2 \alpha(x, y, z) = 0$  and the water/tissue masks. The 3-D Laplace equation was solved with a 7-stencil finite difference approach with a Jacobi iteration scheme. The boundary conditions were defined in the same way as for the 2-D case explained above, except that the domain of the moving volume being added was constrained by the tissue mask.

#### 4.2.5 Optical Attenuation Estimation

Vignetting effects were compensated for in each tile prior to using the stitching algorithm. The tissue tiles containing agarose were first identified by applying the Li threshold method (Li & Tam, 1998) to separate them into background and foreground volumes. The background mosaic tiles were averaged together, and their Z-axis average intensity projection (AIP) was computed. This agarose AIP was used to compensate for the 2-D vignetting effect introduced by both optic misalignment and beam scanning (Tomažević et al., 2002).

As described in van Leeuwen et al. (van Leeuwen et al., 2003), the sampling beam of a single-mode fiber reduces to a Gaussian beam, and its confocal point-spread function (PSF) adds a depth-

dependent intensity contrast to each A-line. To compensate for this effect, multiple A-lines in agarose were averaged [see Figure 4.3(a)]. Then, a tissue model affected by the axial component of the Gaussian beam PSF  $h(z)$  was fitted on the average agarose profile to find the beam parameters: the focal plane depth  $z_f$  and the effective Rayleigh length  $z_R$

$$h(z) = \left[ \left( \frac{z - z_f}{z_R} \right)^2 + 1.0 \right]^2 \quad (4.10)$$

A single PSF profile was synthesized using the extracted parameters and used to normalize each A-line in the dataset. This method assumes that the depth-dependent signal attenuation in agarose is negligible compared with the signal roll-off introduced by the microscopes axial PSF.

The signal attenuation within each A-line was then computed. The common approach to tissue attenuation estimation is to fit an exponential function on an average A-line and to report the extracted signal decay with depth obtained from this regression. The fitted equation is usually a single-scattered photon model and assumes that the attenuation coefficient is constant over the A-line scanning range. In addition to the loss of axial resolution, another drawback of this approach is the artefact that appears when the A-line traverses inhomogeneous tissues (e.g., as shown for deeply embedded fiber bundles using PS-OCT (H. Wang, Zhu, & Akkin, 2014)). To address these limitations, depth-resolved local tissue attenuation coefficients were estimated using the method introduced by Vermeer et al. (Vermeer et al., 2014), which assumes that detected photons have experienced a single scattering event. A second assumption of this model is that the backscattering photons measured are a fixed fraction of the attenuated photons. Following this model, the attenuation at a given depth  $i$  is given by

$$\hat{\mu}(i) = \frac{1}{2\Delta} \log \left[ 1 + \frac{I(i)}{\sum_{j=i+1}^{\infty} I(j)} \right] \quad (4.11)$$

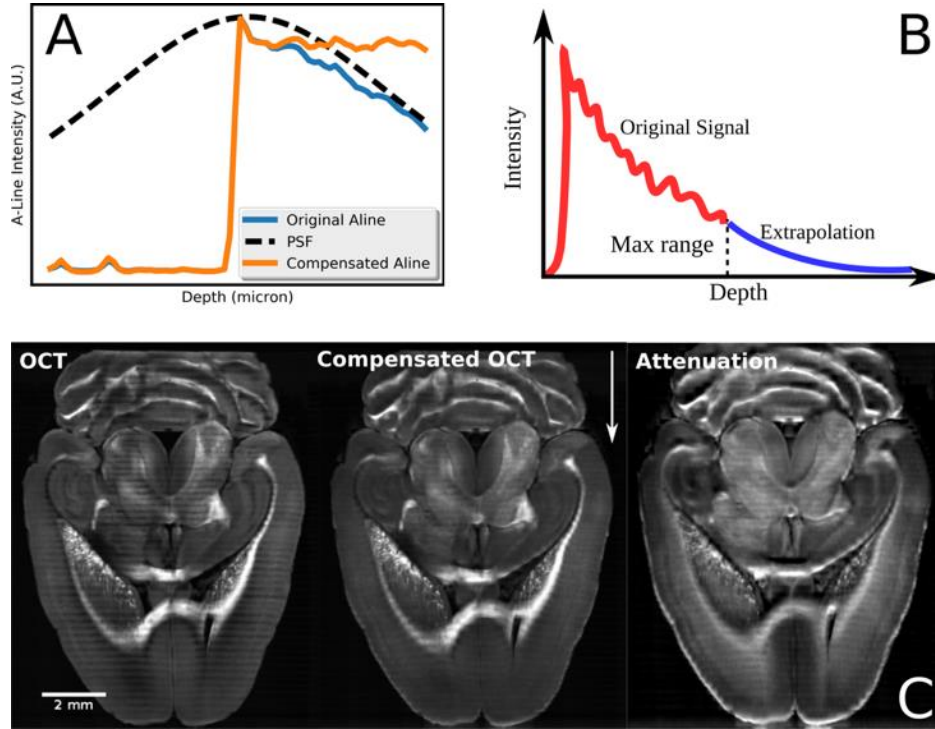
where  $\Delta$  is the axial resolution. Another assumption of this model is that most photons have been attenuated by the end of the A-line scanning range. This is not always the case, depending on the tissue being scanned. This results in artificially high attenuation values that become larger as the A-line depth increases. To relax this condition, an extended version of the Vermeer model was used (Hohmann et al., 2015) [Figure 4.3(b)]. The average attenuation within the tissue was computed for each A-line using the smoothed axial gradient of the signal. The average attenuation coefficient was used to extrapolate the signal below the A-line scanning range. The Vermeer model was used with these extended A-lines. The final attenuation maps were cropped to only keep values

within the original scanning range. Finally, the attenuation maps were stitched together using the same mosaic positions and blending weights as for the OCT reflectivity tiles [Figure 4.3(c), right].

These estimated attenuation coefficient maps were used to compute an attenuation correction bias field  $B(x, y, z)$  profile for each A-line using Beer–Lambert’s law. The original OCT tissue slices were normalized by these attenuation correction fields during the slice stitching process, which allowed for reducing signal intensity discontinuities between consecutive tissue slices [Figure 4.3(c)]

$$B(x, y, z) = \exp \left[ -2 \int_0^z \hat{\mu}(x, y, z) dz \right] \quad (4.12)$$

$$I'(x, y, z) = \frac{I(x, y, z)}{B(x, y, z)} \quad (4.13)$$



*Figure 4.3 (a) Example of an axial PSF extraction from an average A-line within agarose. (b) Schematic of the A-line signal extrapolation method used to reduce attenuation coefficients biases. (c) AIPs over 250  $\mu\text{m}$  of a horizontal slice from a reconstructed mouse brain. (Left) original OCT reflectivity contrast, (middle) reflectivity contrast compensated for the depth-dependent signal attenuation, and (right) the computed attenuation coefficient map. The white arrow indicates the direction of the MOA. The tissue was cut along the coronal plane with the cerebellum facing the microscope.*

### 4.2.6 OCT Brain Template Creation

An average OCT brain template was created to be able to compare the contrasts and segmentation results of each individual brain (see Figure 4.4). As will be discussed in Sec. 4.2.8, this OCT template was also used by the multimodal registration of the OCT brains with the dMRI data. The template creation methodology is based on existing algorithms in the literature (Avants et al., 2010; Kuan et al., 2015) and uses the ANTs (Avants, 2017). The normalization process was done with a subset of the assembled brains ( $n = 4$ ). Furthermore, to get a symmetric template, the normalization also included the brain's mirror version obtained by flipping them along the midsagittal plane. Each brain was first aligned to the Allen mouse brain reference template (Allen Institute for Brain Science, 2016) using rigid and affine transforms and a mutual information metric. The average volume obtained by this coarse alignment was used as an initial reference template for the normalization procedure. The normalization was done iteratively, using the average template of iteration  $k$  as a reference for the  $k + 1$  iteration. Each iteration consisted of a sequence of rigid, affine, and symmetric normalization diffeomorphic (SyN, (Avants et al., 2008)) registrations done at four scales each and using the mutual information metric. A total of  $M = 20$  normalization iterations were done. Finally, the OCT mouse brain templates were registered to the Allen mouse brain template using a sequence of rigid, affine, and SyN registrations. For computational reasons, the template creation was done at a subsampled resolution of  $50\ \mu\text{m}$  per voxel. These OCT mouse brain templates will be publicly available on our laboratory website (F Lesage, 2017).

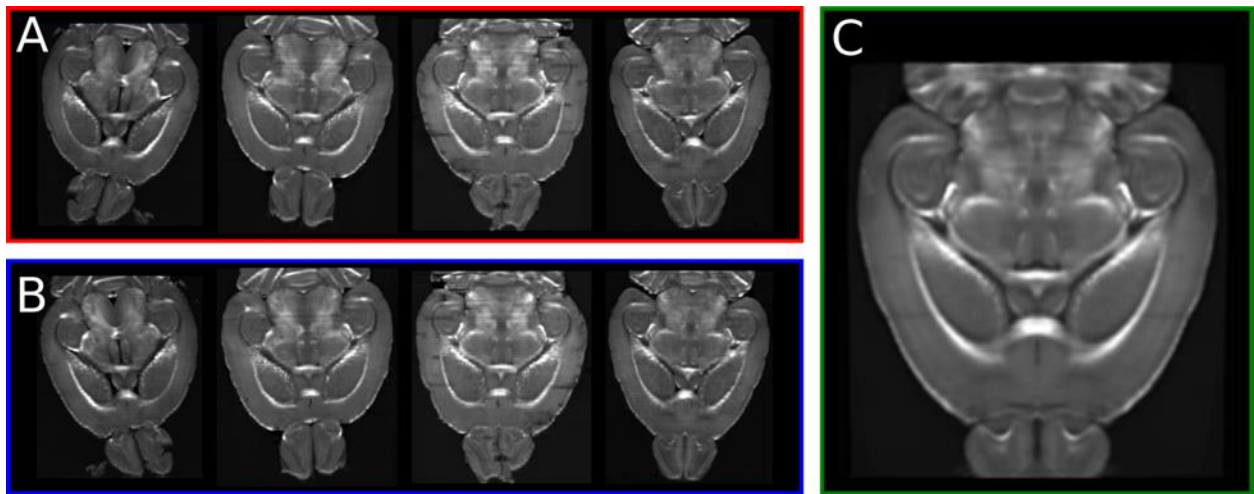


Figure 4.4 (a) Horizontal slices of the OCT reflectivity brains used for the template creation. (b) Mirrored version of the brain shown in (a) that were also used by the template creation algorithm.



(c) *Resulting OCT reflectivity brain template after  $M = 20$  iterations. All brains were downsampled to an isotropic resolution of  $50 \mu\text{m}$  per voxel.*

#### 4.2.7 OCT Brain Image Segmentation

Given the observed visual contrast between white and gray matter, the Atropos algorithm (Avants, Tustison, Wu, et al., 2011), an  $n$ -tissue segmentation method developed for MRI data and part of ANTs, was used for segmenting the brain tissue from the combination of the OCT reflectivity and attenuation contrasts. The reflectivity and attenuation contrasts were combined to form a 4-D matrix, the first three dimensions being the  $X$ -,  $Y$ -, and  $Z$ -axes and the fourth dimension being a two-length vector with elements being the reflectivity and attenuation contrasts. A Markov random field with a radius of  $1 \times 1 \times 1$  voxel and weight  $w = 0.3$  was used to regularize the segmented volumes. The mathematical expression of the multivariate  $n$ -tissue segmentation method is described elsewhere (Avants, Tustison, Wu, et al., 2011). All brains were registered to the Allen mouse brain common coordinate framework (CCF) (Allen Institute for Brain Science, 2016) prior to the tissue classification procedure, which allowed visual comparisons of the segmented tissue classes with the Allen mouse brain atlas. This segmentation procedure was applied to all individual brains and to the OCT brain template.

The segmentation algorithm was initialized using  $K$ -means clustering combined with a Gaussian mixture model (GMM) (Pedregosa et al., 2012). The optimal number of classes  $n$  was determined by computing the Bayesian information criterion (BIC) for varying values of  $n$ . The GMM associated with the minimum BIC value was chosen (Scikit-Learn Online Community, 2017). Using this criterion, the optimal number of classes was found to be  $n = 5$ . Thus, the tissue was segmented into five classes corresponding to (1) low and (2) high attenuation gray matter, white matter fibers (3) parallel and (4) orthogonal to the direction of the MOA, and (5) other white matter regions exhibiting high attenuation and reflectivity contrasts. These tissue class names were chosen based on the visual comparisons of the segmented labels with the Allen mouse brain atlas structures and based on the reflectivity and attenuation statistics per tissue label (see the results section and Figure 4.7). To restrict the segmentation process to tissue voxels only, the brain and ventricles were masked prior to the Atropos algorithm application. The brain tissue was segmented with a global intensity threshold determined by the Otsu method combined with a morphological watershed

algorithm. The ventricles were excluded from this segmentation process by delineating them using the ITKSNAP (Yushkevich et al., 2006) tool prior to the Atropos algorithm application.

Finally, the tissue labels obtained from the OCT brain template segmentation were used by the Atropos algorithm as *a priori* information to guide the segmentation in other assembled brains. An advantage of this approach is a reduction in the effect of acquisition variability and artefacts on the segmentation results by imposing an *a priori* bias to the classification problem. This was done with the fifth mouse brain that was also acquired with dMRI. The volume was first coregistered to the symmetric OCT template. Then, the Atropos algorithm was used as described above, but by replacing the initialization step by the OCT brain template's tissue label map and using a prior weight of  $w = 0.15$ . The average reflectivity and attenuation coefficients per tissue classes were then computed and reported in Figure 4.7.

#### 4.2.8 OCT and dMRI Coregistration and Comparison

In qualitative estimates of the attenuation coefficient maps, white matter with different orientations was apparent in images suggesting a compensation for fiber orientation (e.g., see the anterior commissure in Figure 4.9). To validate this, an assembled brain was coregistered to a FA map obtained from a dMRI acquisition of the same animal (Figure 4.5). Registration templates were used to align the two imaging modalities together as this method was found to be more robust than directly aligning the individual brains (Kuan et al., 2015). To summarize the registration algorithm, the OCT reflectivity and attenuation maps were aligned to the OCT brain templates. Then, the precomputed transforms from the OCT brain template to the Allen mouse brain were applied. Similar registration steps were done with the dMRI metrics. The FA volume was first aligned to a publicly available dMRI mouse brain template (Jiang & Johnson, 2010). This FA template was then coregistered to the Allen mouse brain. Thus, both the OCT brain volumes and the dMRI data were mapped to the Allen mouse CCF, which allowed voxelwise comparisons of the contrasts. All registrations were done with ANTs with a sequence of rigid, affine, and SyN transforms at four scales and using the mutual information similarity metric. The coregistration was done at a resampled isotropic resolution of  $50\ \mu\text{m}$  to match the resolution of the OCT brain template.

The angles between the direction of the MOA of the OCT brain and the fiber bundle orientations given by the water diffusion data were computed. The OCT signal dependence on fiber orientation could then be investigated. Other MRI metrics were also compared with the reflectivity and

attenuation contrasts: the FA, the AFD\_max, and the number of fibers orientations within a voxel (NuFO). Plots of the average OCT reflectivity and attenuation signal as a function of these dMRI metrics were generated as follows. First, each dMRI metric was separated into 32 equidistant intervals. Then, 3-D masks indicating the spatial location in the brain of the voxels included in each dMRI metric interval were created. These masks were applied to the OCT reflectivity and attenuation maps. The plots in Figure 4.8 report the average reflectivity and attenuation values for each dMRI metric value interval. The error intervals are expressed as the standard error of the mean ( $SEM = \sigma/\sqrt{N}$ ), with  $N$  being the number of voxels in each interval and  $\sigma$  being the standard deviation of the reflectivity/attenuation values for these voxels.

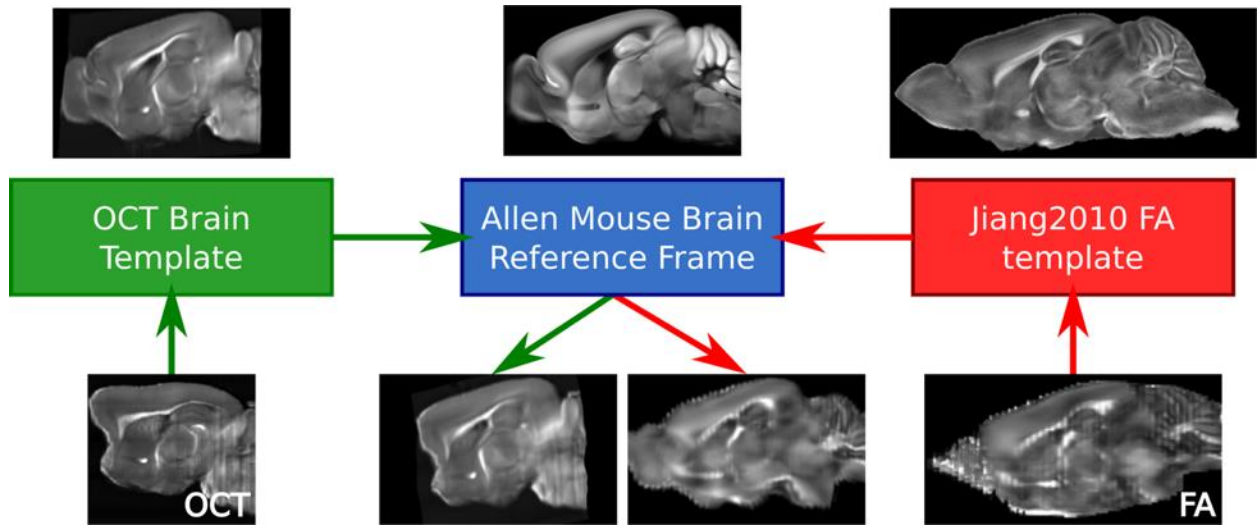


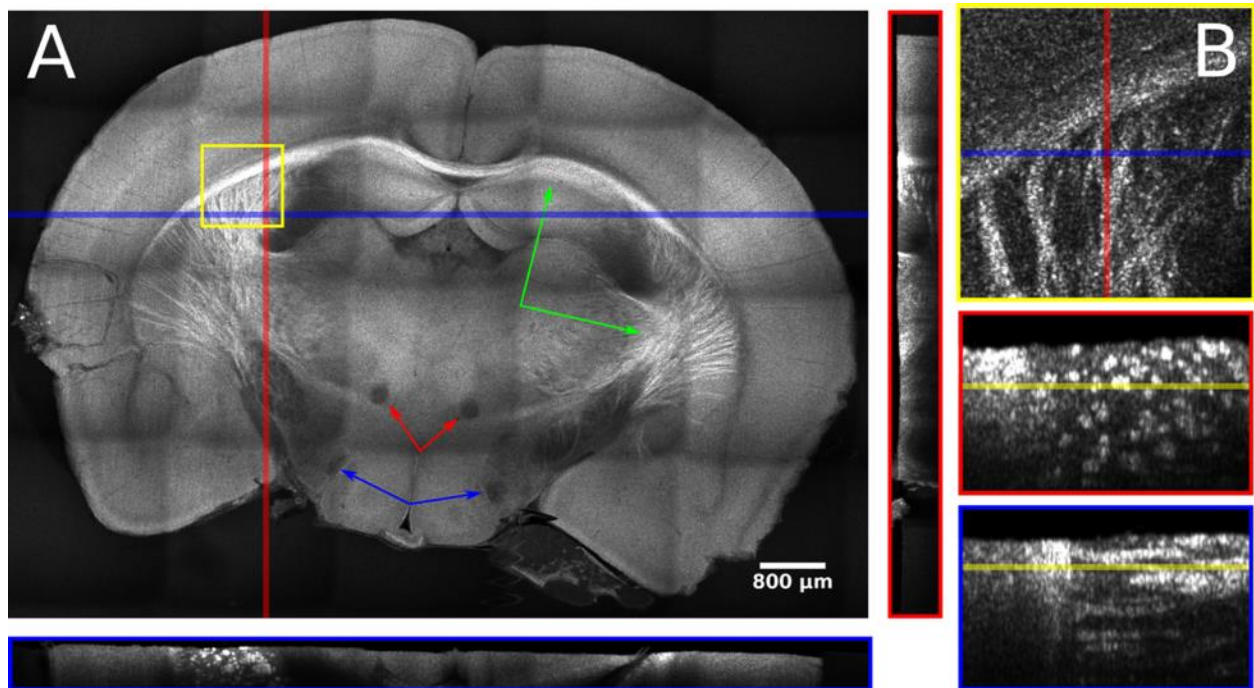
Figure 4.5 Example of the multimodal registration algorithm. The OCT brain template generated in this work and a publicly available dMRI mouse brain template (Jiang & Johnson, 2010) were used as intermediary registration templates. Each arrow indicates the registration of a given volume onto another (for example the OCT brain was mapped to the OCT brain template and then mapped to the Allen mouse brain).

## 4.3 Results

### 4.3.1 Volumes Acquisition and Reconstruction

Typically, an acquisition of a mouse brain using a 3X microscope objective generated a mosaic of shape  $7 \times 5 \times 70$  at a sampling resolution of  $4.8 \times 4.8 \times 6.5 \mu m^3$ . This represents around 320 GB of disk space. Figure 4.6 shows a reconstructed coronal brain tissue slice at the original microscope's sampling resolution. Due to the large amount of data, the OCT volumes were

resampled prior to reconstruction at an isotropic resolution of  $25\ \mu\text{m}$  per voxel, which resulted in a final brain volume size of around 300 MB. Figure 4.3(c) shows a horizontal section within an assembled brain at a resolution of  $25\ \mu\text{m}/\text{voxel}$  with three contrasts: (1) OCT reflectivity, (2) compensated OCT reflectivity, and (3) estimated signal attenuation. The compensated OCT map was obtained by dividing the OCT reflectivity signal by the cumulated attenuation for a given depth (Eq. 4.12). This normalization removed the signal attenuation caused by the sampling depth and by highly scattering structures traversed by the sampling beam. The remaining contrast in the compensated OCT map was due to local differences of refractive index in the brain microstructure. Indeed, the attenuation compensation increased the backscattering signal under highly scattering structures (e.g., under the corpus callosum or the arbor vitae). It also uniformized the backscattering contrast in homogeneous areas such as in the neocortex. For the white matter fibers, the backscattering contrast was higher due to the layered structure of the myelin sheaths. Also, (Leahy et al., 2013) proposed that the backscattering coefficient changes based on the fiber tract orientation in relation to the direction of the incident beam. Our data corroborate this model, as illustrated by the anterior commissure olfactory and temporal limbs in Figure 4.9.



*Figure 4.6 (a) AIP of an OCT reflectivity tissue slice reconstructed at the original anisotropic sampling resolution of  $4.8 \times 4.8 \times 6.5\ \mu\text{m}^3$ . Neither the axial PSF nor the XY vignetting effect were compensated for in this example to better represent the raw data aspect. Each volumetric tile has a field of view of  $2.5 \times 2.5 \times 0.8\ \text{mm}^3$  and an overlap with their neighbors of around 0.5 mm.*

*The arrows indicate the mammillothalamic tracts (red), the columns of the fornix (blue), and the corpus callosum and the striatum (green). (b) Coronal, sagittal, and horizontal slices within the delineated yellow region in (a), showing fibers in the striatum and the corpus callosum. The tissue was sliced along the coronal plane, with the cerebellum facing the microscope objective.*

The stitching algorithms were implemented in Python and were integrated as a suite of tools in a private galaxy server (Afgan et al., 2016) running in a Docker container (Docker Inc, 2017) on an 8 cores/32 GB RAM computer (64 bits). This implementation strategy was chosen to allow multiple users to launch data reconstructions simultaneously. The galaxy server can be installed on a cluster engine to provide more processing power and thus reduce computing time if needed. The tissue preparation and acquisition process took  $\sim 10$  h (including perfusion, surgery, agarose embedding, and slicing). The reconstruction with the galaxy server took another 3 h per brain. Tests were done with the stitching algorithm on a computing cluster (called Briarée and located at Calcul Québec) using 4 nodes of 12 cores each and 24 GB of RAM per node. The reconstruction time using the computing cluster was reduced to about 1 h for brains at the full resolution. Thus, the acquisition process using this high-throughput histology setup took between 1/2 and 1 day overall to image and reconstruct a whole mouse brain in 3-D at an isotropic resolution of  $25\ \mu\text{m}$  per voxel.

### 4.3.2 Attenuation Coefficients Estimation

The 3-D attenuation map resulted in a higher contrast for all white matter fibers in the brain (see Figure 4.9), even those parallel to the optical axis. For example, in the anterior commissure the olfactory and temporal limbs exhibit low and high OCT reflectivity contrasts, respectively, but a high attenuation value compared with gray matter. The average OCT reflectivity  $\langle R \rangle$  and attenuation coefficients  $\langle \mu \rangle$  measured for each tissue class are reported in Figure 4.7. To summarize, the largest attenuation coefficient was found in the fibers orthogonal to the optical axis ( $24 \pm 5\ \text{cm}^{-1}$ ), followed by the myelin-rich tissue ( $20 \pm 3\ \text{cm}^{-1}$ ), the fibers parallel to the optical axis ( $20 \pm 5\ \text{cm}^{-1}$ ), the high attenuation gray matter ( $15 \pm 2\ \text{cm}^{-1}$ ), and the low attenuation gray matter ( $11 \pm 1\ \text{cm}^{-1}$ ). For the reflectivity contrast, the gray matter classes and the fibers parallel to the direction of the sampling beam had similar reflectivity (around 0.23). The myelin rich tissue ( $0.35 \pm 0.05$ ) and the fibers orthogonal to the direction of the incident beam ( $0.55 \pm 0.1$ ) exhibited larger reflectivity values. These results were computed using the OCT template segmentation labels. Similar results were obtained with the individual brain segmentation labels. Interestingly, the histograms in Figure 4.7 show that it was the combination of reflectivity and attenuation that

allowed the separation of each tissue class. Thus, if the segmentation was only based on the reflectivity contrast, it would have not been possible to separate the gray matter and fibers parallel to the MOA as they all have similar reflectivity values. Similarly, a segmentation based solely on the attenuation coefficient contrast would not be able to separate the three white matter classes as they all have similar attenuation coefficients.

The largest attenuation coefficient variations were within both fiber bundle classes. One cause of this variability is that the fibers in each group are not precisely orthogonal or parallel to the direction of the MOA, thus introducing intermediary attenuation values. In addition, the Markov random field regularization and the resolution downsampling can introduce partial volume effects that mix the contrasts from different tissue components. Other sources of attenuation coefficients variations include coregistration errors, artefacts introduced by the attenuation model, tissue slicing defects, and global brain orientation variations.

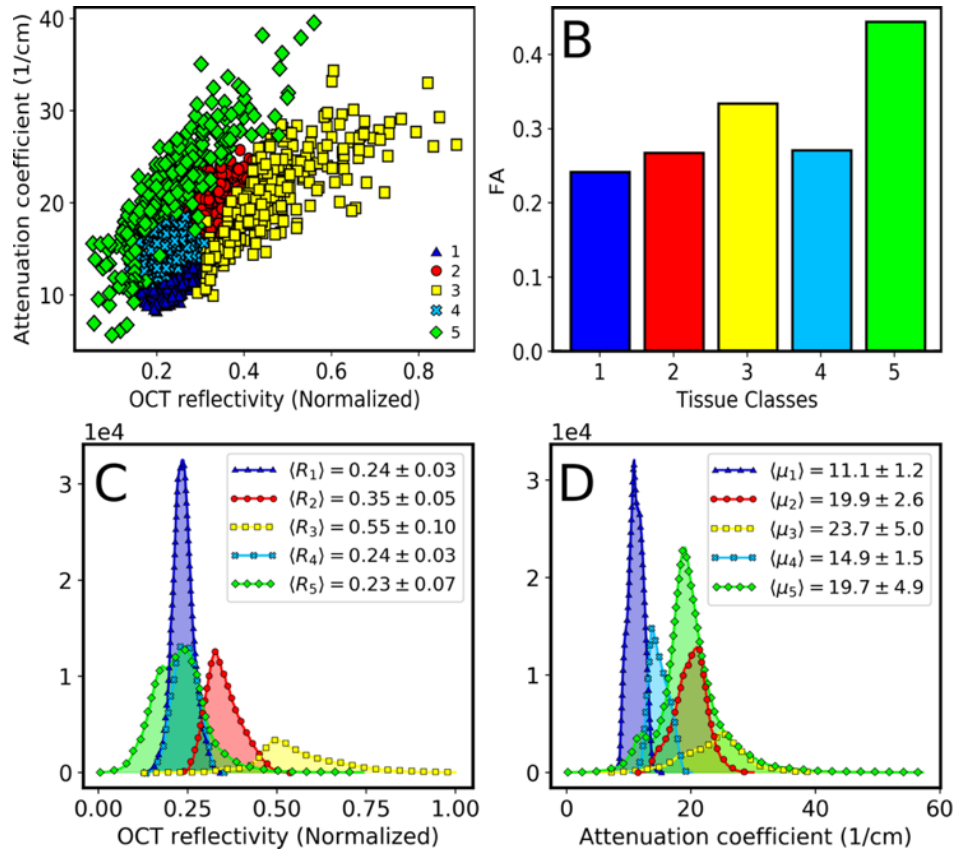


Figure 4.7(a) Scatterplot of the OCT reflectivity and attenuation contrasts by tissue classes obtained from the OCT brain template segmentation results. For each label,  $N = 750$  sample voxels were selected randomly. (b) Average FA computed for each segmented tissue label. (c) OCT reflectivity and (d) attenuation coefficient histograms per tissue classes. The average values per

*label are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The label colors are the same as shown in Figure 4.9.*

### **4.3.3 Correlation Between dMRI and OCT**

The correlations between the diffusion MRI metrics and the optical contrasts are shown in Figure 4.8. These comparisons were made on a single assembled brain that was coregistered to its FA map. This map was measured for the same animal after its sacrifice and before skull extraction and histological acquisition. A threshold value of  $FA = 0.4$  was used to separate the voxels into tissue and white matter tracts. This FA threshold was chosen to extract both the single-direction fiber tracts ( $FA > 0.6$ ) and the crossing fiber areas, which are associated with FA values between 0.4 and 0.6 (Dell'Acqua et al., 2013).

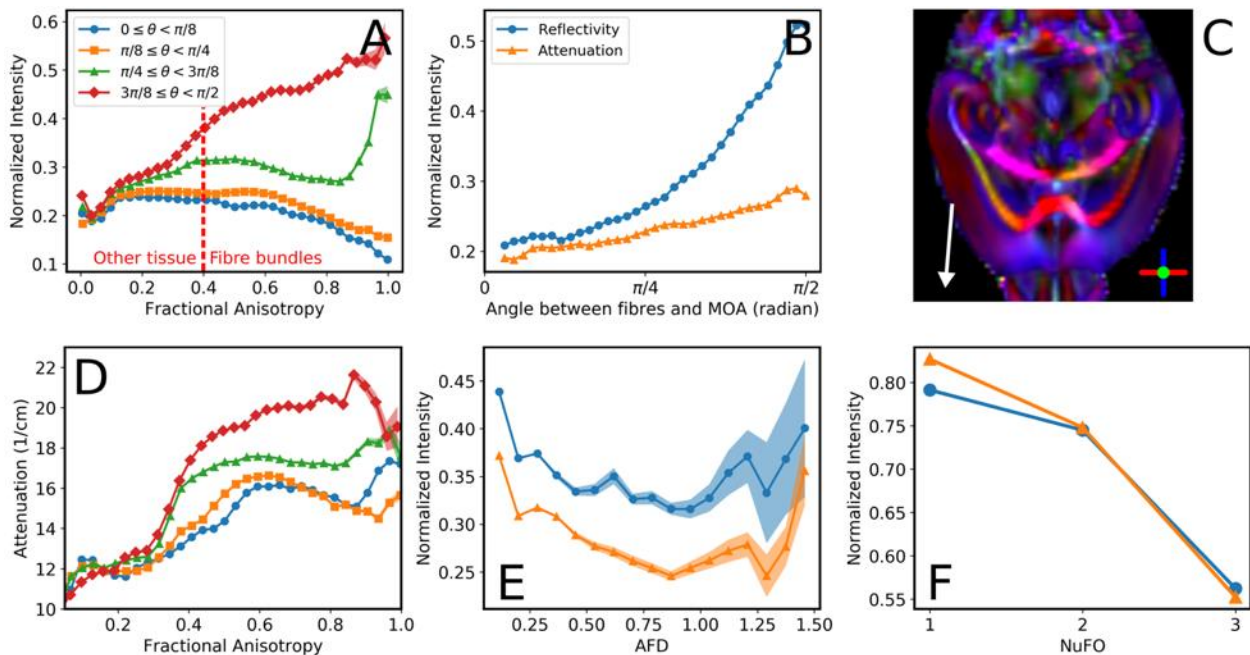
The optical contrast variation with fiber bundle orientation as measured by dMRI is shown in Figure 4.8(b). Consistent with observations reported previously in the literature (Leahy et al., 2013), the OCT signal was higher for fibers orthogonal to the direction of the MOA. For example, in Figure 4.6(a), the mammillothalamic tracts (red arrows) and columns of the fornix (blue arrows) are parallel to the MOA and appear darker than the surrounding tissue, as opposed to the corpus callosum and striatum (green arrows), which contain fibers parallel to the MOA. This characteristic was also observed for the attenuation coefficients. This can be explained in part by the attenuation model assumption that states that the measured backscattered signal is a fixed fraction of the attenuated light. This assumption results in a linear relationship between reflectivity and attenuation, which can be observed in the Figure 4.7 scatterplot.

The multimodal comparison of OCT with diffusion MRI also revealed that reflectivity and attenuation in fibers orthogonal to the direction of the incident beam increase with FA Figure 4.8(a). For fibers that are parallel to the incident beam, a negative correlation is observed between these measures. This result can be explained with partial volume effects and the orientation dependence of the OCT signal in fiber bundles. Each fiber bundle orientation population within a voxel will exhibit a different orientation-dependent OCT contrast Figure 4.8(b). For crossing fiber areas, low reflectivity (parallel) and high reflectivity (orthogonal) fibers are mixed and contribute to the measured OCT signal in different proportions. As FA becomes larger, the fibers within a bundle will be better aligned. If the bundle main orientation is orthogonal to the MOA, the reflectivity signal will increase as the proportion of low reflectivity parallel fibers in the bundles



diminishes. This partial volume effect is consistent with the observed negative correlation of OCT contrast with the number of fibers orientations within a voxel [NuFO, Figure 4.8(f)]. Some causes of FA variations in white matter are the presence of crossing fibers, fiber dispersion, fiber bundle density, or microstructural architecture of the cellular membranes (A. L. Alexander et al., 2007). These fiber bundles characteristics should be considered when interpreting OCT contrasts in white matter.

Another source of OCT contrast variation seems to be the fiber bundle density, as shown by the negative correlation of both reflectivity and attenuation with the AFD\_max (Figure 4.8(e)). The observed decrease of the OCT signal with density is counterintuitive and will require further investigation. A hypothesis to explain this effect is that the scattering anisotropy of fiber bundles increases with fiber density, in which case forward scattering becomes prominent, thus reducing the perceived reflectivity of the fiber bundle. The decrease of attenuation with density could be due to the use of an attenuation model that assumes a constant fraction of backscattered photons to attenuated photons. Future work focusing on fiber bundles exhibiting various density values is planned, including Monte Carlo simulations that can help better understand the origin of the OCT contrast.



*Figure 4.8 Correlation between the dMRI metrics and the OCT contrasts. The average reflectivity (a) and attenuation coefficient (d) are plotted as a function of FA for different fiber bundle orientations. Also, these OCT contrasts are reported as a function of the angle between the fibers*



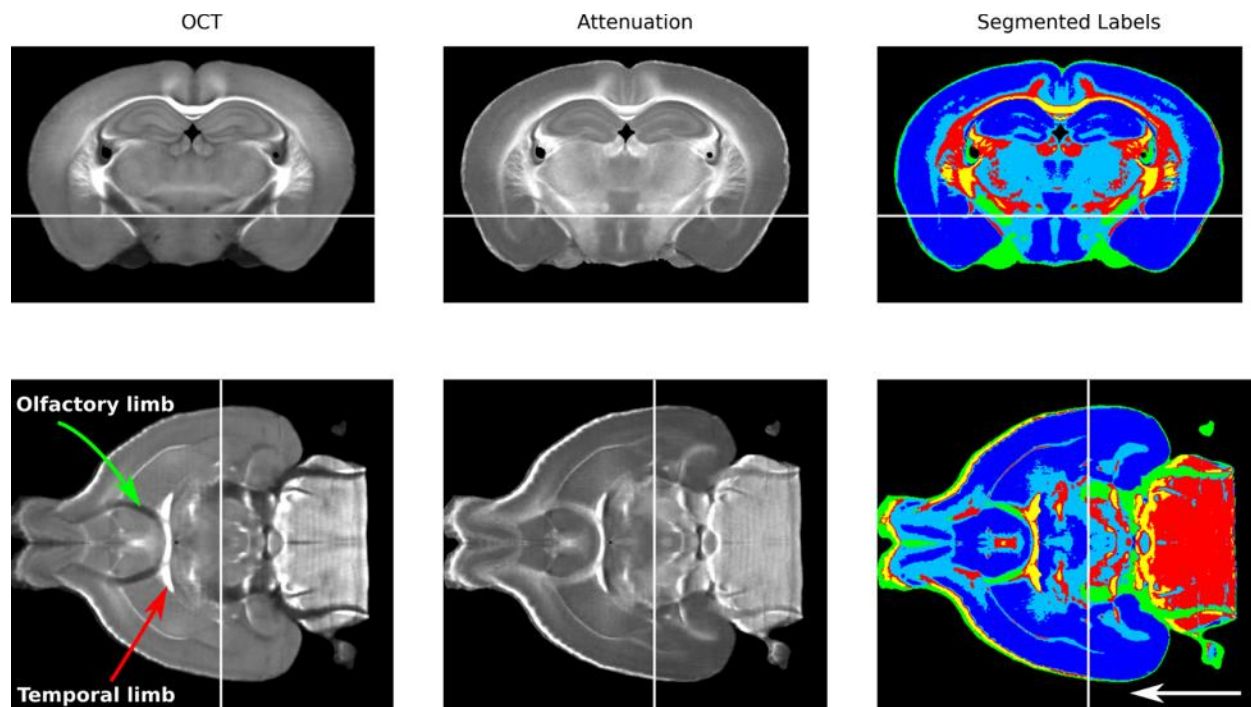
*and the direction of the MOA (b), the AFD\_max (e), and the number of fibers orientations within a voxel (NuFO, f). The error intervals represent the standard error of the mean ( $\sigma/\sqrt{N}$ ). (c) Main tissue orientations given by the dMRI acquisition. The white arrow represents the direction of the MOA given by coregistering the assembled brain with the FA volume. The average values in (e) and (f) were computed within the fiber bundles only by imposing a threshold of  $FA > 0.4$ .*

#### 4.3.4 Tissue Segmentation

The tissue classification was first performed on all individual brains and on the OCT brain template without using prior information to guide the segmentation. The segmentation results for the brain template are reported in Figure 4.9. Based on visual inspection, the five segmented tissue classes for each brain were similar. Quantitatively, an average Dice similarity coefficient of  $0.82 \pm 0.03$  was obtained when comparing the segmentation results among all the individual brains. This Dice score indicates that the segmentation method is accurate when similar classification initialization was used for each brain. The segmentation differences among individual samples can be caused by coregistration errors, morphological differences among the individual brains, or differences in cutting artifacts, for example.

The optical contrast dependencies on fiber orientations were used by the segmentation algorithm to distinguish between fiber tracts and myelin-rich brain tissues. Indeed, the average FA values per tissue label [Figure 4.7(b)] show that the fiber bundles orthogonal (yellow) and parallel (green) to the MOA exhibit a larger FA signal than those in the myelin-rich tissue (red). For example, the medulla (Figure 4.9, red) contains many densely packed crossing fibers that result in high reflectivity and attenuation contrasts and in a low water diffusion FA, as opposed to the spinocerebellar tract (Figure 4.9, green) that was classified as a parallel fiber tract due to its remaining orientation-dependent contrast. The low FA values computed in each tissue class can be caused by misclassification errors or by crosstalk between each label. This arises from the design of the segmentation method, which only considers the combined reflectivity and attenuation contrasts distributions without prior morphological information. As a consequence, different tissue types exhibiting similar contrasts can be classified into the same class, or voxels inside a single morphological structure are classified into different labels. An example of this misclassification can be seen in Figure 4.9 where part of the corpus callosum was labeled as orthogonal fibers (yellow) and as myelin-rich tissue (red).

The segmentation results reveal that another source of OCT contrast seems to be related to the density of myelinated fibers in brain tissue, as defined by the ratio of neuronal cell bodies to neurites (myelinated axons and dendrites) volume fractions. Using optical coherence microscopy, (Srinivasan et al., 2012) showed that the cell bodies exhibit lower scattering coefficients than myelinated fibers, which increase the signal attenuation in myelin rich tissue. This contrast mechanism could be responsible for the distinct classification of the thalamus and hypothalamus (Figure 4.9, light blue), the medulla (Figure 4.9, red), and the neocortex (Figure 4.9, dark blue). Indeed, the scatterplot in Figure 4.7(a) reveals that each of these tissue areas is associated with increasing reflectivity and attenuation values. Similarly, using polarization sensitive OCT, (Liu et al., 2016) showed that the attenuation coefficient was significantly different among the MLs, the GLs, and the white matter regions of mice's cerebellar slices. In histology, the granular and molecular layers are delineated based on their neuronal cell body densities, with the molecular layer being sparse and the granular layer being densely packed (Mescher & Junqueira, 2013). This relationship between the OCT contrast and neurite density will be evaluated in future work.



*Figure 4.9 Five-tissue segmentation results using an OCT/attenuation mouse brain template ( $n = 4$ ). (a)–(c) A coronal slice and (d)–(f) a horizontal slice. (a) and (d) The OCT reflectivity contrast, (b) and (e) the estimated attenuation coefficients, and (c) and (f) the segmentation results for the same slices. The white arrow indicates the direction of the MOA. The red and green arrows in (d) point to the temporal and olfactory limbs of the anterior commissure, respectively. The green*

*and yellow labels represent white matter fiber bundles parallel and orthogonal to the MOA, the dark and light-blue labels contain mostly gray matter tissues, and the red label represents other tissues with high myelin content (e.g., medulla, pons, and midbrain).*

## 4.4 Discussion

This paper presented a massive histology setup that combined an automated tissue slicing apparatus with an OCT microscope. An image reconstruction method adapted to the large number of volumetric tiles generated by this microscope was summarized, and the challenges were presented. The depth-resolved local tissue attenuation coefficients were estimated using a single scattering model. Average symmetric mouse brain templates were generated for both OCT reflectivity and attenuation contrasts. These templates were used to perform a multimodal registration of an assembled OCT brain with a dMRI brain acquired for the same animal. Finally, a multivariate segmentation method based on the Atropos algorithm was used to label brain tissue automatically into five components: (1) low and (2) high attenuation gray matter, (3) myelin-rich brain tissue, and white matter fibers (4) parallel and (5) orthogonal to the direction of the MOA.

The main goal of this paper was to investigate the OCT contrast to help future interpretations of serial OCT acquisitions. Thus, the dMRI data were used to better understand the OCT contrast mechanisms within brain tissue. The data showed that the OCT signal within a fiber bundle depends on its orientation, density, and NuFO. Furthermore, the separation of gray matter into high and low attenuation groups indicates that the neurite volume fraction of brain tissue might be an additional factor influencing the OCT contrast. These hypotheses will be investigated in a future multimodal study.

The multimodal comparisons relied on the precise coregistration of the assembled OCT brain with the MRI data. Indeed, small brain structure misalignment may cause the comparison of white fiber bundles in MRI with surrounding brain tissue in the assembled OCT brain. As the AFD\_max, NuFO, and main diffusion orientation metrics are defined in fiber bundles only, perfect alignment of the white matter anatomical features was necessary. Missing anatomical structures (e.g., missing cerebellum) and acquisition-related deformations can introduce registration errors. To alleviate this effect, intermediary registration templates were used (Kuan et al., 2015). The elaboration of an

acquisition protocol to limit and prevent tissue deformations between each modality would be required if more subjects need to be analyzed.

The OCT brain template created for this study can be used in a number of ways. For example, it can be used in cross-sectional studies to follow the alteration of white matter in animal models of arteriosclerosis or normal aging and generate mouse brain templates at multiple aging stages. Combined with measurement of the microvasculature in the same brains using confocal microscopy or two-photon microscopy, this could give insight into the role of neurovascular impairments on the development of neuropathologies. Also, the attenuation contrast combined with local image texture analysis can be used to measure various fiber properties (e.g., orientation, density, and dispersion), which could feed tractography algorithms designed to obtain structural connectomes in ex vivo brains. Also, the reconstruction algorithm developed can stitch other types of tissue (such as aorta (P. L. Tardif et al., 2016) or heart) and other optical modalities (e.g., multiphotons microscopy, CARS microscopy, and fluorescence confocal microscopy).

The segmentation algorithm presented in this paper does not use *a priori* morphological information to guide the classification. It is only based on the intrinsic reflectivity and attenuation contrasts of brain tissue as measured by the OCT microscope. A limitation of this approach is that the segmentation results are highly sensitive to the initialization and to any OCT contrast variations. Another limitation of the segmentation method is that the reported tissue class names were based on visual inspection of the segmented structures when compared with the Allen mouse brain atlas. The labels were not validated using other independent measurements (e.g., with conventional histology or with an existing white matter segmentation). The segmentation method was used mainly to gain insight into the principal contrast mechanisms of OCT in brain tissue. The classification errors and variability show that naively associating OCT contrast with white matter might not be adequate, and we aimed to identify other factors that could explain the observed contrast. Ways to improve the tissue classification method could be to (1) use additional contrasts (e.g., retardance and birefringence measured by PS-OCT (H. Wang et al., 2011) or texture based measures. (H. Wang et al., 2015)) and (2) use an atlas-based approach to add morphological *a priori* information (Badea et al., 2012; Kuan et al., 2015).

In the review of biological tissue optical properties by (Jacques, 2013), the average reduced scattering coefficient  $\mu'_s$  reported for brain tissues at a wavelength of 1300 nm is  $5.19 \text{ cm}^{-1}$ . This

value is an average of  $8 \mu'_s$  reported in the literature (Bevilacqua et al., 1999; Sandell & Zhu, 2011; Yi & Backman, 2012), with  $\mu'_s$  between 2 and  $8.5 \text{ cm}^{-1}$  depending on the area probed or the measurement protocol. The attenuation coefficient values measured in the present experiment range from 11 to  $23 \text{ cm}^{-1}$ . A few tissue preparation and acquisition-related aspects could explain this discrepancy. Brain perfusion, tissue extraction, agarose embedding, waiting time between tissue preparation and acquisition, or even the duration of the MRI acquisition could all have an impact on the optical properties of the tissue. For example, the brains were all perfused with gadolinium to increase their MRI signal. This could increase the tissue absorption coefficient and thus introduce a bias in the attenuation values estimated. Another indication that the MRI acquisition could have an impact on tissue optical properties was observed during the slicing process. When compared with mouse brain sliced for another ongoing study, the mouse brains that were imaged with MRI *ex vivo* were affected by more cutting errors (cutting plane denivelation, water–tissue interface rugosity, tissue tearing, and floating fibers). These cutting errors suggest mechanical property changes that could also impact the tissue optical properties. This tissue alteration may be caused by thermal deposition during the MRI acquisitions. Further investigation is needed to validate this hypothesis.

Some attenuation coefficient variations could also arise from the algorithm used to estimate this optical property from the A-lines data. For instance, one reason for this discrepancy could be that the measured attenuation is modulated by the agarose profile. Indeed, for PSF extraction, the agarose attenuation was considered negligible. If this is not the case, a bias is introduced in all other measured attenuation values because those are given relative to agarose attenuation. Also, the PSF was assumed to be the same for all A-line lateral positions. This hypothesis does not hold true when large fields of view are scanned or when some parts of the microscope are misaligned. In such cases, the focal plane is curved and the PSF profile intensity should vary laterally. A better PSF extraction method considering the tissue geometry, optical aberrations, and a spatially varying confocal PSF will improve the attenuation estimation results. Such a model could also use the ray transfer matrix formalism to model the microscope setup and could integrate agarose attenuation measurements for calibration. An alternative to PSF extraction is to measure the background signal in agarose or water prior to tissue acquisition. Other sources of variability may come from partial volume effects, attenuation artefacts, noise sources associated with the data acquisition, and labeling errors.

The assumption that all photons have been attenuated by the end of the A-line did not always hold. Thus, the attenuation map diverged toward large values as the scan depth increased. This effect was more visible in gray matter tissue and agarose because of their lower attenuation coefficients. Also, this effect was more important when the slices exhibit large water–tissue interface depth denivelation due to cutting errors. In this work, this limitation was addressed by extrapolating the reflectivity signal under each A-line and then using this extended A-line to compute the attenuation using the Vermeer model. The extrapolation approach can introduce artefacts because it is blind to any morphological structures that are under the A-line depth scanning range. A better approach could take advantage of the underlying tissue slices revealed by the automated histology and use signal extension by interpolation instead of extrapolation. Other possible solutions are to introduce a regularization function to relax this assumption for deeper tissue (Smith et al., 2015) or to use a more complete tissue attenuation model that considers multiple scattering events and scattering anisotropy (Thrane et al., 2004; Turchin et al., 2005).

Finally, some segmentation errors were caused by the attenuation artefacts introduced when the A-lines traversed a highly scattering medium (e.g., brain tissue) followed by a low scattering medium (e.g., water or agarose). This situation was encountered in ventricles and around the brain bottom side borders. This caused the attenuation to be artificially high in these transition areas, which were mistakenly considered as white matter by the segmentation algorithm. A similar artefact arose when transitioning from low to high scattering tissue (e.g., gray to white matter). These areas resulted in negative attenuation coefficients and were thus assigned a null value. These two artefacts will be taken into account by improving the tissue interaction model to consider tissue transition explicitly.

## 4.5 Conclusion

The reconstruction method developed resulted in 3-D maps of the tissue optical reflectivity and attenuation in whole rodent brains. To get an accurate estimation of the tissue attenuation coefficient, the microscope’s confocal axial PSF was estimated from the data and used to normalize each OCT A-line prior to the stitching process. An average mouse brain template was generated for both the reflectivity and attenuation contrasts, and these templates were used to segment myelinated fibers in the assembled brains. Finally, dMRI was used to get insight into the OCT contrast origin in brain tissue. The OCT signal dependence on fiber bundles microstructure and

orientation, and on the neurite density in gray matter, should be considered when interpreting OCT data in brain tissue. Future work will combine attenuation and reflectivity data to measure local microstructural properties of myelinated axons, and these measures will be compared with equivalent observations from MRI acquisitions.

## Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

## Acknowledgments

This work was supported by a Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT) to J. Lefebvre and A. Castonguay, CIHR to F. Lesage, by NSERC Discovery Grant program, as well as the institutional Université de Sherbrooke Research Chair in Neuroinformatics to M. Descoteaux and by an NSERC Discovery Grant, RGPIN-2014-06089 to P. Pouliot. Computations were made on the supercomputer Briarée from the Université de Montréal, managed by Calcul Québec and Compute Canada. The operation of this supercomputer is funded by the Canada Foundation for Innovation (CFI), the ministère de l'Économie, de la science et de l'innovation du Québec (MESI), and the Fonds de recherche du Québec-Nature et technologies (FRQ-NT). The mouse brain dMRI template used in this paper was a courtesy of the Duke Center for In Vivo Microscopy. This paper is an extended and revised version of the Proc. SPIE 10070 presented at the SPIE Photonics West BIOS conference in February 2017.

## 4.6 References

- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., ... Goecks, J. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic acids research*, 44(W1), W3-W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
- Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., & Field, A. S. (2007). Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*, 4(3), 316-329. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>
- Allen Institute for Brain Science. (2016). *Allen mouse common coordinate framework*. Technical Report (Version 2).
- Amunts, K., Lepage, C., & Borgeat, L. (2013). BigBrain: an ultrahigh-resolution 3D human brain model. *Science*, 340(6139), 1472-1475. <https://doi.org/10.1126/science.1235381>

- Avants, B. B., Epstein, C., Grossman, M., & Gee, J. C. (2008). Symmetric diffeomorphic image registration with cross-correlation: Evaluating automated labeling of elderly and neurodegenerative brain. *Medical Image Analysis*, 12(1), 26-41.  
<https://doi.org/10.1016/j.media.2007.06.004>
- Avants, B. B., Yushkevich, P., Pluta, J., Minkoff, D., Korczykowski, M., Detre, J., & Gee, J. C. (2010). The optimal template effect in hippocampus studies of diseased populations. *NeuroImage*, 49(3), 2457-2466. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.062>
- Avants, B. B., Tustison, N. J., Wu, J., Cook, P. a., & Gee, J. C. (2011). An open source multivariate framework for n-tissue segmentation with evaluation on public data. *Neuroinformatics*, 9(4), 381-400. <https://doi.org/10.1007/s12021-011-9109-y>
- Avants, B. B. (2017). Advanced normalization tools (ANTs). Github Repository, Version v2.1.0-789-g0740f9, <https://github.com/stnava/ANTs>
- Badea, A., Gewalt, S., Avants, B. B., Cook, J. J., & Johnson, G. A. (2012). Quantitative mouse brain phenotyping based on single and multispectral MR protocols. *NeuroImage*, 63(3), 1633-1645. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.021>
- Bevilacqua, F., Piguet, D., Marquet, P., Gross, J. D., Tromberg, B. J., & Depeursinge, C. (1999). In vivo local determination of tissue optical properties: applications to human brain. *Applied Optics*, 38(22), 4939. <https://doi.org/10.1364/AO.38.004939>
- Blender Online Community. (2016). Blender - a 3D modelling and rendering package. Blender Foundation. Consulté à l'adresse <https://www.blender.org>
- Calamante, F., Tournier, J.-D., Kurniawan, N. D., Yang, Z., Gyengesi, E., Galloway, G. J., ... Connelly, A. (2012). Super-resolution track-density imaging studies of mouse brain: comparison to histology. *NeuroImage*, 59(1), 286-296.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.014>
- Castonguay, A., Avti, P. K., Moeini, M., Pouliot, P., Tabatabaei, M. S., Bélanger, S., & Lesage, F. (2015). Investigating the correlation between white matter and microvasculature changes in



aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. *SPIE BiOS*, 9328, 93281M.

<https://doi.org/10.1117/12.2077830>

Dell'Acqua, F., & Catani, M. (2012). Structural human brain networks. *Current Opinion in Neurology*, 1. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328355d544>

Dell'Acqua, F., Simmons, A., Williams, S. C. R., & Catani, M. (2013). Can spherical deconvolution provide more information than fiber orientations? Hindrance modulated orientational anisotropy, a true-tract specific index to characterize white matter diffusion. *Human Brain Mapping*, 34(10), 2464-2483. <https://doi.org/10.1002/hbm.22080>

Descoteaux, M., Wiest-Daesslé, N., Prima, S., Barillot, C., & Deriche, R. (2008). Impact of Rician Adapted Non-Local Means Filtering on HARDI (p. 122-130). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85990-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85990-1_15)

Descoteaux, M., Deriche, R., Knösche, T. R., & Anwander, A. (2009). Deterministic and probabilistic tractography based on complex fibre orientation distributions. *IEEE transactions on medical imaging*, 28(2), 269-286. <https://doi.org/10.1109/TMI.2008.2004424>

Docker Inc. (2017). Docker documentation. Docker. Version 17.03. Consulté à l'adresse <https://docs.docker.com>

Dyrby, T. B., Lundell, H., Burke, M. W., Reislev, N. L., Paulson, O. B., Ptito, M., & Siebner, H. R. (2014). Interpolation of diffusion weighted imaging datasets. *NeuroImage*, 103, 202-213. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.09.005>

Fu, Y., Huff, T. B., Wang, H.-W., Cheng, J.-X., & Wang, H. (2008). Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Express*, 16(24), 19396. <https://doi.org/10.1364/OE.16.019396>

Garyfallidis, E., Brett, M., Amirbekian, B., Rokem, A., van der Walt, S., Descoteaux, M., & Nimmo-Smith, I. (2014). Dipy, a library for the analysis of diffusion MRI data. *Frontiers in Neuroinformatics*, 8. <https://doi.org/10.3389/fninf.2014.00008>

- Hohmann, M., Lengenfelder, B., Kanawade, R., Klämpfl, F., & Schmidt, M. (2015). Extension of depth-resolved reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography for slim samples. Dans *SPIE Biophotonics Japan* (Vol. 9792, p. 97920P). Tokyo, Japan.  
<https://doi.org/10.1117/12.2205030>
- Jacques, S. L. (2013). Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in medicine and biology*, 58(11), R37-61. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/11/R37>
- Jiang, Y., & Johnson, G. A. (2010). Microscopic diffusion tensor imaging of the mouse brain. *NeuroImage*, 50(2), 465-471. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.12.057>
- Jones, D. K., Horsfield, M. A., & Simmons, A. (1999). Optimal strategies for measuring diffusion in anisotropic systems by magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 42(3), 515-525. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2594\(199909\)42:3<515::AID-MRM14>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2594(199909)42:3<515::AID-MRM14>3.0.CO;2-Q)
- Kremer, a., Lippens, S., Bartunkova, S., Asselbergh, B., Blanpain, C., Fendrych, M., ... Guérin, C. J. (2015). Developing 3D SEM in a broad biological context. *Journal of Microscopy*, 259(2), 80-96. <https://doi.org/10.1111/jmi.12211>
- Kuan, L., Li, Y., Lau, C., Feng, D., Bernard, A., Sunkin, S. M., ... Ng, L. (2015). Neuroinformatics of the allen mouse brain connectivity atlas. *Methods*, 73, 4-17.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.013>
- Leahy, C., Radhakrishnan, H., & Srinivasan, V. J. (2013). Volumetric imaging and quantification of cytoarchitecture and myeloarchitecture with intrinsic scattering contrast. *Biomedical Optics Express*, 4(10), 1913-1978. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001978>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., & Lesage, F. (2017). White matter segmentation by estimating tissue optical attenuation from volumetric OCT massive histology of whole rodent brains. Dans T. G. Brown, C. J. Cogswell, & T. Wilson (Éd.), *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* (Vol. 10070, p. 1007012). <https://doi.org/10.1117/12.2251173>

- Lesage, F., Castonguay, A., Tardif, P. L. L., Lefebvre, J., & Li, B. (2015). Investigating the impact of blood pressure increase to the brain using high resolution serial histology and image processing. Dans *Wavelets and Sparsity XVI* (Vol. 9597, p. 95970M). San Diego, CA: SPIE Proceedings. <https://doi.org/10.1117/12.2189110>
- Lesage, F. (2017). LIOM - Shared resources. Consulté 28 juin 2017, à l'adresse [http://liom2.polymtl.ca/en/shared\\_resources](http://liom2.polymtl.ca/en/shared_resources)
- LeVeque, R. J. (2007). *Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations*. Society for Industrial and Applied Mathematics. <https://doi.org/10.1137/1.9780898717839>
- Li, C., & Tam, P. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters*, 19(8), 771-776. [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(98)00057-9)
- Liu, C. J., Williams, K. E., Orr, H. T., & Akkin, T. (2016). Visualizing and mapping the cerebellum with serial optical coherence scanner. *Neurophotonics*, 4(1), 011006. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.4.1.011006>
- Magnain, C., Augustinack, J. C., Reuter, M., Wachinger, C., Frosch, M. P., Ragan, T., ... Fischl, B. (2014). Blockface histology with optical coherence tomography: A comparison with Nissl staining. *NeuroImage*, 84, 524-533. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.072>
- Mescher, A. L., & Junqueira, L. C. U. (2013). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 13th Edition*. (N. Y. : M.-H. Medical, Éd.) (13th éd.).
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., ... Zeng, H. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... Duchesnay, É. (2012). Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12, 2825-2830. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Preibisch, S., Saalfeld, S., & Tomancak, P. (2008). Fast stitching of large 3d biological datasets. Dans *Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference*.
- Price, D. L., Chow, S. K., MacLean, N. A. B., Hakozaki, H., Peltier, S., Martone, M. E., & Ellisman, M. H. (2006). High-resolution large-scale mosaic imaging using multiphoton microscopy to characterize transgenic mouse models of human neurological disorders. *Neuroinformatics*, 4(1), 65-80. <https://doi.org/10.1385/NI>
- Raffelt, D., Tournier, J.-D., Rose, S., Ridgway, G. R., Henderson, R., Crozier, S., ... Connelly, A. (2012). Apparent Fibre Density: A novel measure for the analysis of diffusion-weighted magnetic resonance images. *NeuroImage*, 59(4), 3976-3994. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.10.045>
- Ragan, T., Kadiri, L. R., Venkataraju, K. U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., ... Osten, P. (2012). Serial two-photon tomography: an automated method for ex-vivo mouse brain imaging. *Nature methods*, 9(3), 255-258. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1854.Serial>
- Sandell, J. L., & Zhu, T. C. (2011). A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *Journal of Biophotonics*, 4(11-12), 773-787. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100062>
- Scikit-Learn Online Community. (2017). Gaussian mixture model selection. Scikit-Learn Documentation. Consulté à l'adresse [http://scikit-learn.org/%0Dstable/auto\\_examples/mixture/plot\\_gmm\\_selection.html](http://scikit-learn.org/%0Dstable/auto_examples/mixture/plot_gmm_selection.html)
- Smith, G. T., Dwork, N., O'Conner, D., Sikora, U., Lurie, K. L., Pauly, J. M., & Ellerbe, A. K. (2015). Automated, Depth Resolved Estimation of Attenuation Coefficient From Optical Coherence Tomography Data. *IEEE Transactions in Medical Imaging*, 34(12), 2592-2602. <https://doi.org/10.1109/TMI.2015.2450197>
- Srinivasan, V. J., Radhakrishnan, H., Jiang, J. Y., Barry, S., & Cable, A. E. (2012). Optical coherence microscopy for deep tissue imaging of the cerebral cortex with intrinsic contrast. *Optics Express*, 20(3), 2220. <https://doi.org/10.1364/OE.20.002220>

- Tardif, P. L., Bertrand, M. J., Abran, M., Castonguay, A., Lefebvre, J., St??hli, B. E., ... Lesage, F. (2016). Validating intravascular imaging with serial optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17122110>
- Thrane, L., Frosz, M. H., Jørgensen, T. M., Tycho, A., Yura, H. T., & Andersen, P. E. (2004). Extraction of optical scattering parameters and attenuation compensation in optical coherence tomography images of multilayered tissue structures. *Optics Letters*, 29(14), 1641. <https://doi.org/10.1364/OL.29.001641>
- Tomažević, D., Likar, B., & Pernuš, F. (2002). Comparative evaluation of retrospective shading correction methods. *Journal of Microscopy*, 208(3), 212-223. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2002.01079.x>
- Tournier, J.-D., Calamante, F., & Connelly, A. (2007). Robust determination of the fibre orientation distribution in diffusion MRI: Non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. *NeuroImage*, 35(4), 1459-1472. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.016>
- Turchin, I. V., Sergeeva, E. a., Dolin, L. S., Kamensky, V. a., Shakhova, N. M., & Richards-Kortum, R. (2005). Novel algorithm of processing optical coherence tomography images for differentiation of biological tissue pathologies. *Journal of biomedical optics*, 10(6), 064024. <https://doi.org/10.1117/1.2137670>
- Tustison, N. J., Avants, B. B., Cook, P. a, Yuanjie Zheng, Egan, A., Yushkevich, P. a, & Gee, J. C. (2010). N4ITK: Improved N3 Bias Correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(6), 1310-1320. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2046908>
- Vandenberghe, M. E., Hérard, A.-S., Souedet, N., Sadouni, E., Santin, M. D., Briet, D., ... Delzescaux, T. (2016). High-throughput 3D whole-brain quantitative histopathology in rodents. *Scientific reports (in revision)*, (January 2015), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep20958>

- van Leeuwen, T. G., Faber, D. J., & Aalders, M. C. (2003). Measurement of the axial point spread function in scattering media using single-mode fiber-based optical coherence tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 9(2), 227-233. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2003.813299>
- Vermeer, K. a, Mo, J., Weda, J. J. a, Lemij, H. G., & de Boer, J. F. (2014). Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 5(1), 322. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.000322>
- Wang, H., Black, A. J., Zhu, J., Stigen, T. W., Al-Qaisi, M. K., Netoff, T. I., ... Akkin, T. (2011). Reconstructing micrometer-scale fiber pathways in the brain: Multi-contrast optical coherence tomography based tractography. *NeuroImage*, 58(4), 984-992. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.005>
- Wang, H., Zhu, J., & Akkin, T. (2014). Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *NeuroImage*, 84, 1007-1017. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.09.063>
- Wang, H., Zhu, J., Reuter, M., Vinke, L. N., Yendiki, A., Boas, D. A., ... Akkin, T. (2014). Cross-validation of serial optical coherence scanning and diffusion tensor imaging: A study on neural fiber maps in human medulla oblongata. *NeuroImage*, 100, 395-404. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.06.032>
- Wang, H., Lenglet, C., & Akkin, T. (2015). Structure tensor analysis of serial optical coherence scanner images for mapping fiber orientations and tractography in the brain. *Journal of Biomedical Optics*, 20(3), 036003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.3.036003>
- Yi, J., & Backman, V. (2012). Imaging a full set of optical scattering properties of biological tissue by inverse spectroscopic optical coherence tomography. *Optics Letters*, 37(21), 4443-4445. <https://doi.org/10.1364/OL.37.004443>
- Yushkevich, P. A., Piven, J., Hazlett, H. C., Smith, R. G., Ho, S., Gee, J. C., & Gerig, G. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved

efficiency and reliability. *NeuroImage*, 31(3), 1116-1128.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.015>

## CHAPITRE 5     ARTICLE 2: FULLY AUTOMATED DUAL-RESOLUTION SERIAL OCT AIMED AT DMRI VALIDATION IN WHOLE MOUSE BRAINS

Ce deuxième article aborde les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> objectifs de la thèse. Il présente le système OCT sériel bi-résolution (2R-SOCT) développé à partir du SOCT existant. L'OCT à faible résolution (3X) sert de repère stéréotaxique pour l'OCT à haute résolution (40X). Les cerveaux de souris imagés avec le SOCT sont utilisés dans le pipeline de coregistration multimodale développé pour le premier article. Ainsi, les données 2R-SOCT sont alignées avec des mesures d'IRM de diffusion (IRMd) acquises pour les mêmes échantillons avant la session d'imagerie histologique. Deux stratégies de sélection des régions d'intérêts 40X ont été développées (manuelle et automatique). Les données générées avec ce système ont été comparées à l'IRMd et elles ont révélé une bonne correspondance entre les microstructures observées par OCT 40X et plusieurs métriques IRMd (anisotropie fractionnelle, nombre d'orientations de fibres, densité apparente des fibres, dispersion des orientations et fraction volumique intracellulaire). Cet article a été soumis au journal *Neurophotonics* le 23 juillet 2018. Il s'agit d'une version améliorée et beaucoup plus détaillée du compte rendu (J. Lefebvre et al., 2018), qui a été le sujet d'une présentation orale lors de la conférence SPIE Photonics West – BIOS en février 2018.

*Authors :* Joël Lefebvre<sup>1</sup>, Patrick Delafontaine-Martel<sup>1</sup>, Philippe Pouliot<sup>1,2</sup>, Hélène Girouard<sup>3</sup>, Maxime Descoteaux<sup>4</sup>, Frédéric Lesage<sup>1,2</sup>

1 : Laboratoire d'imagerie optique et moléculaire, École Polytechnique de Montréal, Canada

2 : Research Centre, Montréal Heart Institute, Université de Montréal, Canada

3 : Institut universitaire de gériatrie de Montréal, Université de Montréal, Canada

4 : Sherbrooke Connectivity Imaging Laboratory, Université de Sherbrooke, Canada

**Abstract.** An automated dual-resolution serial optical coherence tomography (2R-SOCT) scanner was developed. The novel serial histology system combines a low-resolution ( $15\mu\text{m}/\text{voxel}$ ) 3X OCT with a high-resolution ( $1.5\mu\text{m}/\text{voxel}$ ) 40X OCT to acquire whole mouse brains at low resolution, and to target specific regions of interest (ROIs) at high resolution. The 40X ROIs positions were selected either manually by the microscope operator or using a new automated ROI position selection algorithm. Additionally, a multimodal and multiresolution registration pipeline



was developed in order to align the 2R-SOCT data onto diffusion MRI data acquired in the same *ex vivo* mouse brains prior to automated histology. Using this new imaging system, 3 whole mouse brains were imaged and 250 high resolution 40X 3D ROIs were acquired. The capability of this system to perform multimodal imaging studies was demonstrated by labeling the ROIs using a mouse brain atlas and by categorizing the ROIs based on their associated dMRI metrics. This revealed a good correspondence of the tissue microstructure imaged by the high resolution OCT with various dMRI metrics such as fractional anisotropy, number of fiber orientations, apparent fiber density, orientation dispersion and intracellular volume fraction.

**Keywords.** Serial histology, Diffusion MRI, Optical Coherence Tomography, Whole mouse brain imaging, Multimodal registration

## 5.1 Introduction

Automated blockface histology is a maturing imaging technology that combines a tissue slicing apparatus, a motorized sample stage and a microscope in order to image whole samples in 3D at high resolution. The common principle shared by all serial blockface histology methods is the repeated removal of small tissue layers to reveal new sample cross-sections. This destructive imaging approach circumvents the limited penetration depth of light in tissue, and the motorized stage enables the acquisition of entire sample cross-sections even with an imaging system using limited field-of-view (FOV) optics. Advantages of blockface imaging include the low quantity of sample deformation introduced by the tissue slicing process, its simple sample preparation protocol and overall short acquisition time when compared to other serial histology methods such as serial histopathology (Vandenberghe et al., 2016) or serial electron microscopy (Kremer et al., 2015; Salo et al., 2018). In neuroimaging, automated blockface histology was reported with various optical modalities, ranging from confocal microscopy (Khan et al., 2015), fluorescence two-photon microscopy (Oh et al., 2014a; Price et al., 2006; Ragan et al., 2012), CARS microscopy (Y. Fu et al., 2008), optical coherence tomography (OCT) (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017), polarization sensitive OCT (Magnain et al., 2014; H. Wang et al., 2015; H. Wang, Zhu, & Akkin, 2014; H. Wang, Zhu, Reuter, et al., 2014), and photoacoustic microscopy (Wong et al., 2017). Serial histology was used to study myelinated fibers (H. Wang et al., 2017, 2018), the neuronal connectome (Kleinfeld et al., 2011; Oh et al., 2014a), the neurovasculature (Frédéric Lesage et al., 2015), Alzheimer's disease (Delafontaine-Martel et al., 2018), etc.

When designing a serial histology system, or when performing an imaging study with such a system, a key aspect to consider is the imaging resolution. Using the tissue intrinsic contrast, high resolution OCT can resolve fine tissue microstructure, such as the neuronal cell bodies (Leahy et al., 2013) and individual myelin fibers (Ben Arous et al., 2011). Despite this advantage, high resolution objectives are used at the expense of longer acquisition times, dataset size increase, as well as more complex and resource-intensive data reconstruction. For example, to acquire an entire mouse brain with a 40X objective offering sampling resolution of 1 micron over FOVs of  $0.5 \times 0.5 \times 0.25 \text{ mm}^3$  would require an estimated acquisition time of 60 days with our current serial OCT imaging system (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017), and would necessitate around 700 TB of disk space to store the dataset. On the other hand, low-resolution objectives offer the advantage of faster acquisition time and small datasets size at the expense of sacrificing tissue microstructure feature detectability. Nonetheless, low resolution serial histology is sometimes desirable. In previous work, a serial OCT system (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017) was used with a 3X objective to perform whole mouse brain acquisitions at a resolution of 15 microns per voxel. The assembled SOCT mouse brains were then exploited to compute an average mouse brain template (Joël Lefebvre, Castonguay, & Lesage, 2017a), which was coregistered to diffusion MRI (dMRI) brain data. The relatively poor resolution of the SOCT data did not allow for direct brain microstructure visualization, but the images are still useful in animal group studies (Castonguay et al., 2017, 2018; P. L. Tardif et al., 2016) and brain-wide investigation of the origin of OCT contrast in neuronal tissue. To take advantage of both the fast acquisition and reconstruction aspects of low-resolution serial histology and of the additional information provided by high-resolution OCT, a novel dual-resolution serial OCT scanner (2R-SOCT) was developed in this work. This system was then used in a multimodal study demonstration to compare the high resolution OCT images acquired automatically with the 2R-SOCT imaging pipeline with dMRI data acquired in the same mouse brains prior to serial histology.

This paper is organized as follows. First, the tissue preparation and acquisition protocol are presented. The dMRI acquisition and analysis are reported. This analysis resulted in various dMRI metrics: the fractional anisotropy (FA), the maximal apparent fiber density (Raffelt et al., 2012) (ADF\_max), the number of fiber orientations (Dell'Acqua & Catani, 2012) (NuFO), the orientation dispersion index (OD), and the intra-cellular volume fraction (Zhang et al., 2012) (IC\_VF). The new dual-resolution serial OCT system is then presented in detail, including the optical design,

automation procedure and OCT data reconstruction algorithms. This is followed by a description of the whole brain OCT volume reconstruction procedure, which was adapted from our previously published methodology (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017). The dual-resolution acquisition paradigm is then described, including two ROI selection strategies (manual and automatic), followed by the automated acquisition process and data reconstruction algorithms. For this study, 3D brain imaging data effectively comes from three imaging modalities (dMRI, low resolution whole brain serial OCT and high resolution OCT). A multimodal and multiresolution registration was developed to compare all modalities. The last part of the methodology section describes an application of the dual-resolution serial OCT histology imaging pipeline to target white matter fibers and to compare the high resolution OCT data with their corresponding dMRI signal. Note that this paper is an extended and revised version of a conference proceeding (J. Lefebvre et al., 2018) presented at the SPIE Photonics West-BIOS conference in February 2018.

The novelty of our proposed dual resolution serial OCT scanner lies in the fully automated acquisition procedure that allows accurate and repeatable positioning of high resolution images within whole mouse brains. The two objectives configuration of the 2R-SOCT system benefits from the advantages of both types of OCT: the 3X OCT volumes are assembled into a single brain which can be aligned to mouse brain templates and other imaging modalities, and the 40X OCT volumes are able to resolve individual myelinated fibers and neuronal cell bodies (Srinivasan et al., 2012). Furthermore, the proposed system does not only work with dual-resolution OCT, but could also be adapted to other optical modalities. For example, using the lower resolution OCT to provide the stereotactic reference for a two-photon fluorescence laser scanning microscope. Another innovation of the 2R-SOCT technique is the automated acquisition procedure for the high-resolution images which remove user bias in the selection of ROIs within the mouse brain. To our knowledge, the imaging pipeline presented in this paper is the first one to enable fully automated serial histology acquisitions at both low and high resolutions and the registration of the acquired data to a reference template. This allows to compare the high resolution images to dMRI metrics in a fully automated and repeatable way. We anticipate that this new imaging technology will prove useful in multimodal MRI validation studies

## 5.2 Methodology

### 5.2.1 Animal Sacrifice and Tissue Preparation

For this study, the Animal Research Ethics Committee of the Montréal Heart Institute approved all surgical procedures in accordance with the Canadian Council on Animal Care recommendations. A total of  $n = 3$  C57Bl/6 mouse brains were used. At sacrifice, the mice were anesthetized with 2-3% isoflurane and perfused transcardially with 20 ml phosphate buffered saline and then by a mixture of 4% paraformaldehyde (PFA) with 1% gadolinium (Gadovist) to reduce the T1 decay time and thus accelerate the dMRI acquisitions. Each mouse head was separated from its body and the skull was cleaned to remove muscles, lower jaw, vertebrae and other tissues. The brain/skull was imaged in Fomblin with a high angular resolution diffusion imaging (HARDI) MRI sequence described in the next section. After a dMRI acquisition, the brain was extracted from its skull and was embedded in a 4% agarose cylindrical block for serial imaging. The agarose gel was oxidized to create covalent cross-links between the embedding medium and brain tissue, thus avoiding tissue separation during the serial histology acquisition. A drawback of the oxidation procedure is that it renders the agarose brittle, which can cause structural damages while slicing with the vibratome. To avoid this effect, the 4% oxidized agarose cylindrical blocks were embedded in larger un-oxidized agarose cylinders that provided better structural support. The agarose preparation and oxidation procedures followed the methodology presented by (Ragan et al., 2012). In between tissue preparation steps and imaging sessions, the samples were kept in 4% PFA at 4°C.

### 5.2.2 Diffusion MRI Acquisition and Analysis

All fixed mouse brains were imaged prior to serial histology with a standard three-dimensional spin echo diffusion MRI sequence (P. W. Jones, 1999), using an Agilent 7 Tesla scanner equipped with 600 mT/m gradients and a custom-built 1-loop cylindrical coil (17 mm diameter, 20 mm long). The dMRI sequence parameters were: TE = 0.022 s, TR = 0.4 s, 70 gradient-encoding directions separated into 3 shells (6 directions with  $b = 400$  s/mm<sup>2</sup>, 15 directions with  $b = 1066$  s/mm<sup>2</sup>, 42 directions with  $b = 2000$  s/mm<sup>2</sup> and seven interlaced acquisitions with  $b = 0$ ),  $\delta = 5$  ms,  $\Delta = 12$  ms, gradient amplitude 312.5 mT/m, FOV = 16 x 12 x 8 mm, and an acquisition matrix of 128 x 96 x 64 giving an isotropic resolution of 125  $\mu$ m, for a total acquisition time of 48 hours. In order to obtain uniform angular coverage, the HARDI acquisition was designed using a generalization of

electrostatic repulsion to multishell (Caruyer et al., 2013). The fixed mouse brains were kept in their skull and stored in PFA at 4°C until the dMRI acquisition session. On the acquisition day, the sample to be imaged was removed from PFA and pat-dried, placed in a modified 10 ml syringe filled with Fomblin and maintained in place with soft foam. Air bubbles were removed from the Fomblin using a vacuum chamber. Finally, the syringe sample holder was positioned in the MRI machine with a custom-built stereotactic platform.

The dMRI data preprocessing consisted in multiple registration, segmentation and denoising steps as follows. First, all diffusion weighted images (DWI) and their associated b-vectors were coarsely rotated by  $\pi/2$  angle increments until they were aligned with the neurological display convention. Then, the first  $b_0$  volumes of each DWI brains were extracted and used to compute an average anatomical brain template. This made use of the open source toolkit Advanced Normalization Tools (ANTS (Avants, 2017)) and an iterative optimal shape and appearance template construction method (Avants et al., 2010). This optimal anatomical template was further aligned to the publicly available DSURQE T2-weighted *ex vivo* mouse brain template (Dorr et al., 2008) using rigid transformations. All DWI data were finally aligned to the anatomical template using rigid transformations, and the same rotations were applied to their associated b-vectors.

Most preprocessing algorithms and dMRI analysis performed in this study required brain segmentation; these were generated using the brain extraction procedure provided in the ANTs toolkit. Briefly, a small subset of the DWI data ( $n = 4$  brains out of 17 samples measured for another ongoing study) was manually segmented using the 3DSlicer software (Fedorov et al., 2012). The 3D masks obtained for each brain were then combined by applying the transformations computed previously to map these brains to the anatomical template, thus providing a brain extraction probability mask. A brain segmentation was obtained for each brain using the *antsBrainExtraction* procedure implemented in the Nipype neuroimaging data processing framework (Gorgolewski et al., 2011). This method first performs a non-linear registration of the data onto the anatomical template, then it performs an  $n$ -tissue segmentation with the Atropos method (Avants, Tustison, Wu, et al., 2011). The pre-computed brain extraction probability mask guides the process. Finally, the resulting masks were inspected in 3DSlicer to remove any segmentation errors.

The remaining diffusion MRI preprocessing steps were performed to reduce noise and imaging artefacts. These denoising steps included eddy current and sample bulk movement compensation (Andersson & Sotiropoulos, 2016), correction of the field homogeneity artefacts (Tustison et al.,

2010), reduction of the Rician noise bias (Descoteaux et al., 2008) and an in-house time-varying signal bias compensation procedure. The last denoising step was required due to the sample temperature variation throughout the acquisition, which induced time-varying water diffusivity. This is a known effect associated with fixed sample imaging (D. C. Alexander et al., 2010; Calabrese et al., 2015). To reduce the dMRI signal drift, the isotropic nature of diffusion in the cerebrospinal fluid (CSF) was exploited. First, the ventricles were segmented by thresholding the voxels in  $b_0$  images based on their intensity. Then, an average signal time profile was computed in the CSF by selecting 1000 voxels at random in the segmented ventricles. Assuming that the signal should be isotropic for each  $b$ -value in the CSF, the average signal was computed for each shell. A synthetic time profile was thus generated using the estimated average value for each shell. The signal drift was extracted by subtracting the synthetic multishell isotropic profile from the measured average time profile within the CSF. Finally, the signal drift was smoothed temporally using a Gaussian filter with  $\sigma = 1$  sub-scan. The time-varying signal was compensated by adding the computed drift bias to all DWI voxels.

Three dMRI analyses were performed on the data. First, in-house implementations (Dell'Acqua et al., 2013; Descoteaux et al., 2009) of diffusion tensor imaging (DTI) and HARDI reconstructions were performed using the Dipy library (Garyfallidis et al., 2014). Fractional anisotropy (FA) was computed from the local diffusion tensors with a non-negative least square method. The constrained spherical deconvolution of Dipy (Descoteaux et al., 2009; J-Donald Tournier et al., 2007) was used to reconstruct the fiber orientation distribution functions (fODF). The principal directions of diffusion in each voxel and the AFD\_max (Dell'Acqua & Catani, 2012; Raffelt et al., 2012), were extracted from the fODF. AFD\_max is the maximal value of the fODF on the sphere, and it can be interpreted as the maximum of the apparent fiber density (AFD). The number of fiber orientations (NuFO) within a voxel was computed with the method presented by (Dell'Acqua et al., 2013) and using a data-driven threshold set to 1.5 times the AFD\_max values in the ventricles. The purpose of this threshold is to remove noisy peaks of the fODF, which are simply high-frequency peaks with low fODF amplitude. The ventricles are used because NuFO should be null there.

The last dMRI analysis performed was the neurite orientation dispersion and density imaging procedure (NODDI) (Zhang et al., 2012). The AMICO python implementation (Daducci et al., 2015) of the NODDI model was used, with isotropic diffusivity  $d_{iso} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ,

longitudinal diffusivity  $d_{\parallel} = 0.6 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  and regularization parameters  $\lambda_1 = 0.5$  and  $\lambda_2 = 1.0 \times 10^{-3}$ . Furthermore, the AMICO *ex vivo* option was used, which adds a fourth constrained water compartment to the NODDI model. This represents the water trapped by the tissue fixation. The choice of *ex vivo* diffusivity values for the isotropic and intracellular compartments was guided by previous values used in the literature (D. C. Alexander et al., 2010; Daducci et al., 2015; Zhang et al., 2012). The NODDI fitting procedure resulted in two maps: orientation dispersion (OD) and the intracellular volume fraction (IC\_VF).

### 5.2.3 Dual Resolution Swept-Source Serial OCT

A dual resolution swept-source serial optical coherence tomography (2R-SOCT) microscope was developed (Figure 5.1). This system is based on our previous single-resolution serial OCT design (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017). The setup consists of 3 main components: (1) a fiber-based Michelson interferometer, (2) dual-resolution free-space sample and reference arms and (3) an automated histology apparatus. The fiber-based Michelson interferometer input was a swept-source laser operated at a central wavelength of  $\lambda_0 = 1310 \text{ nm}$  with a tuning bandwidth of  $\Delta\lambda = 100 \text{ nm}$  (Axsun, 1310 Swept Source Engine). The swept-source laser generated a k-clock used to trigger the OCT volume scans and to acquire interference fringes which are linearly distributed wavenumbers. The swept-source laser output was coupled to a 90/10 fiber coupler (Thorlabs, FC1310-70-10-APC); 90% of the laser power was targeted toward the sample arm and 10% to the reference arm. Single mode fiber optical circulators (Thorlabs, CIR-1310-50-APC) were used in each arm to guide the laser output toward the sample and reference arms using fiber optic collimators, and then to collect the output coming from each arm and send it toward the photodetector. A polarization controller (General Photonics, PolaRITE PLC) was used in the reference arm to adjust the contrast of the back reflected light interference fringes. The reference and sample signals were combined in a 50/50 fiber coupler (Thorlabs, FC1310-70-50-APC) and sent to a balanced photodetector (Thorlabs, PDB120C-AC). The interference fringes were recorded on a computer using a fast 12 bit waveform digitizer (Alazartech, model ATS9350, 500 MS/s).

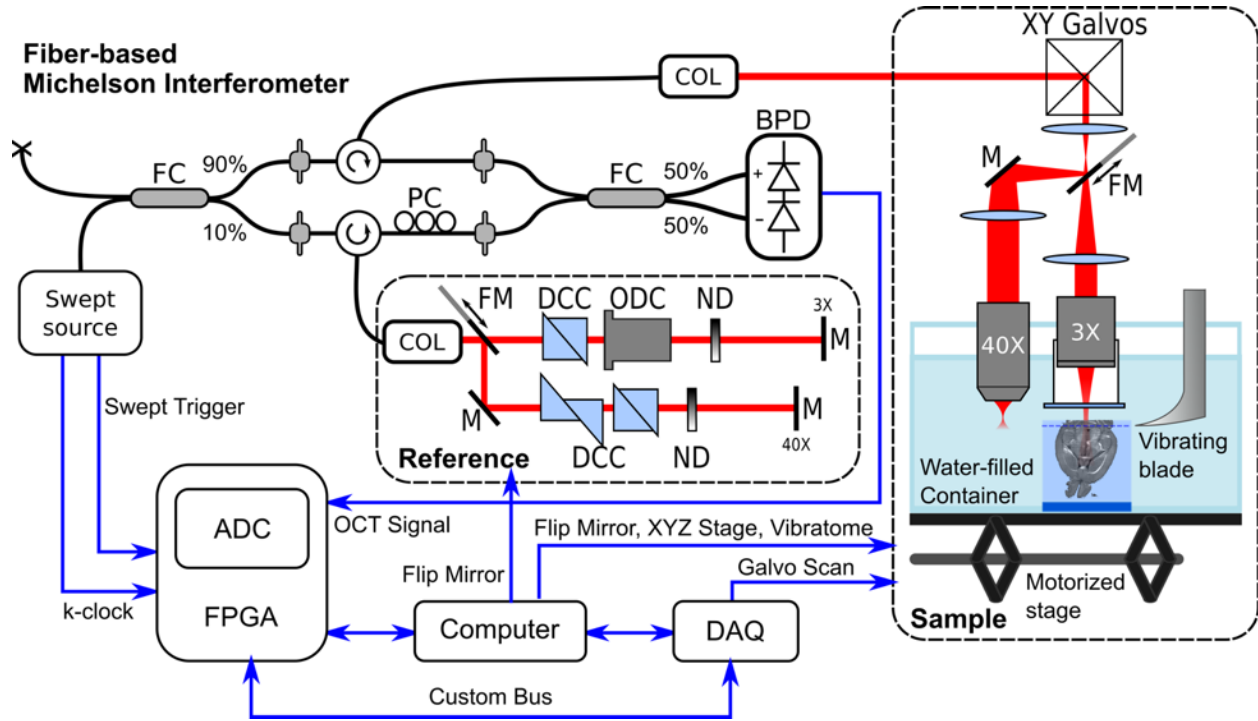


Figure 5.1 Main components of the dual-resolution serial OCT setup. FC: Fiber coupler, COL: Collimator, PC: Polarization Controller, BPD: Balanced Photodetector, FM: Motorized flip mirror, DCC: Dispersion Compensation Cube, ODC: Objective Dispersion Compensator, ND: Variable Neutral Density Filter, M: Mirror, ADC: Analog-Digital Converter, FPGA: Field-programmable Array, DAQ: Data acquisition Card.

The fiber-based Michelson interferometer outputs were connected to dual-resolution free-space sample and reference arms by fixed focus fiber collimators (Thorlabs, F280APC-C). The laser beam was scanned laterally with a small beam diameter galvanometer system (Thorlabs, GVS002). For low-resolution imaging configuration, the galvanometer mirrors output was sent directly to a 3X telecentric scanning lens (Thorlabs, LSM04 Scan Lens) using two optical lenses ( $L_1$  and  $L_{2,3X}$ ) in a telescope configuration. The 3X objective was enclosed in a custom-made watertight immersion chamber terminated by a wedged optical window (Thorlabs, WW11050-C). This immersion chamber had two purposes: 1) protect the scanning lens from the water and biological tissue debris created by the slicing process and 2) impose a constant air/water column in the sample arm. For high-resolution imaging configuration, a motorized flip mirror (Thorlabs, MFF101/M) was introduced between the first and second lenses of the 3X telescope. The laser beam was thus deviated into a second arm and a second telescope lens ( $L_{2,40X}$ ), to end up in a 40X water-dipping microscope objective (Nikon, N40X-NIR). The telescope lenses focal lengths ( $L_1 = 60 \text{ mm}$ ,



$L_{2,3X} = 75 \text{ mm}$ ,  $L_{2,40X} = 125 \text{ mm}$ ), the distance between the 3X and 40X arms ( $D = 50 \text{ mm}$ ) and the immersion chamber height ( $H = 40 \text{ mm}$ ) were optimized based on the target microscope objective aperture and on the axial distance between the 3X and 40X planes. As a result, the low-resolution objective focal plane was located 6.5 mm above the high-resolution focal plane. The free-space reference arm could be switched between 3X / 40X arms in a similar manner using a motorized flip mirror. Dispersion compensation prisms (Thorlabs, PS908L-C) were located in each reference arm to physically compensate for optics induced light dispersion. Additionally, an objective specific dispersion compensator (Thorlabs, LSM04DC) was added to the 3X reference arm. Finally, variable neutral density filters were added to control the intensity of the measured interference fringes. The motorized flip mirrors were controlled directly by the acquisition computer via USB and the galvanometer system was controlled with a data acquisition card (National Instrument, NI-USB-6351).

The automated histology apparatus was the last component of this dual-resolution serial OCT system. The sample was placed in a water-filled acrylic glass container and was maintained in place using a custom-made 3D printed sample holder. Automated serial imaging was achieved by sequentially cutting thin tissue slices (around  $200 \mu\text{m}$ ) with a vibrating blade and by moving the sample under the microscope objective with a motorized stage (Zaber, T-LSR150B). At each motor position, the sampling beam was raster scanned over the objective FOV using galvanometric mirrors. An OCT A-line was acquired for each lateral sampling point, thus resulting in a mosaic of volumetric OCT tiles for each tissue slice. An overlap fraction of 20% was chosen between neighboring tiles to make sure that all tissue areas were covered by the acquisition. After a slice acquisition, the sample was moved axially using a motorized jack (Thorlabs, L490MZ/ M), and this process was repeated until the whole tissue was sliced and imaged. The vibratome, XY stage and Z labjack were all computer controlled using serial port communication. A python3 toolkit was developed to control the serial OCT automated histology acquisitions. The communication with the National Instrument card used the *nidaqmx* python package, and the serial communication with the other devices was performed with the *pyserial* package. Virtual COM ports were allocated to the USB devices (mirror flippers, motorized labjack) to be able to use the same RS-232 communication protocol as for the other devices. The fast waveform digitizer was controlled with the Alazartech Python SDK version 7.1.5. Finally, PyQt5 and the pyqtgraph package were used to

develop a graphical user interface (GUI) that allowed visualization of the acquired data during the acquisition.

Using python, the OCT volume reconstruction was achieved during the acquisition. After each OCT volumetric tile acquisition by the waveform digitizer, the data was transferred directly into memory. The reference interference fringe was computed from the data as the average fringe for a given tile, and this reference was then subtracted from the measured signal. To limit the side lobes introduced by the wavelength swept-source profile, a Gaussian apodization function ( $\mu = 1310 \text{ nm}$ ,  $\sigma = 20 \text{ nm}$ , which corresponds to a PSF of FWHM = 7.5 microns) was multiplied with each fringe. The A-lines at each raster scan position were obtained by computing the inverse Fourier transforms of the preprocessed signal. Only half of the axial range of the reconstructed volumes was recorded due to the Hermitian nature of real-valued signals. The volumes were recorded on a hard disk drive using the Nifti1 file format. In order to reduce the acquisition time, the high resolution OCT volumes acquired with the 40X objective were reconstructed offline, i.e. after the serial histology acquisition.

#### **5.2.4 Whole Brain OCT Volume Reconstruction**

The data reconstruction method used to assemble the low resolution OCT volumetric tiles into a single three-dimensional brain was presented in a previous publication (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017). A key difference with our previous reconstruction model is that the precise tile positions were recorded during the acquisition for each volume, and these positions were used for the reconstruction instead of those given by registration. This modification accelerates the data acquisition and reconstruction procedures, and it provides a common reference frame for the dual-resolution acquisition paradigm described in the next section. Using the recorded XY tile positions, diffusion-based blending weights were computed for each overlap areas between neighboring tiles and were used to stitch the images together. Then, the tissue attenuation coefficient was estimated from the data using a single-scattering model combined with the confocal axial point-spread function (PSF) of the system. The extracted attenuation coefficients were used to compensate the depth-dependent OCT contrast in tissue. The axial translation between consecutive tissue slices was given by the labjack motor microstep position. Using these recorded positions, the slices were assembled into a single brain volume using 3D diffusion-based blending weights. The tissue masks used for the whole brain reconstruction were optimized to ensure an overlap thickness of about 100

microns between consecutive slices. The whole brain reconstruction procedure was performed at an isotropic resolution of 25 microns per voxel.

### **5.2.5 Dual-Resolution Acquisition and Reconstruction**

Two types of dual-resolution acquisitions were performed: (1) fixed focus 40X OCT mosaic acquisitions, and (2) dynamic focusing 40X OCT acquisitions, also known as optical coherence microscopy (OCM). In order to define the ROIs to be imaged, we developed a custom GUI, which allowed the visualization of the last acquired brain slice as an average intensity projection image (AIP). The displayed AIP, which was assembled during the acquisition, was located within the GUI viewport at its accurate Cartesian position given by the recorded motor positions. Using the GUI, any number of ROIs could be added by the microscope operator using either 0.5 mm width square ROIs for the OCM acquisitions or multiple connected line segments ROIs for the fixed focus mosaic acquisitions. The polygon defined by the closed-shaped poly-line ROIs were converted into mosaics of 0.5 mm square tiles with 20% overlap fraction between adjacent tiles. Each ROI characteristics could be modified within the GUI, including the axial position of the first focal plane within the brain tissue, the axial thickness of the OCM acquisition, the spacing between consecutive OCT acquisitions, etc. For this study, the ROIs were defined manually using the GUI for one brain.

A second automatic ROI selection strategy was employed for the two other brains. The ROI locations were generated randomly for a given slice by first segmenting the tissue within the AIP, then by computing a 2D bias probability map to guide the random ROI selection toward fibers and tissue areas exhibiting large contrast variations. To avoid acquiring images outside brain tissues, only ROI positions located within the segmented tissue and at least 250 microns from the agarose/tissue boundary were kept. Also, a parameter was used to control the maximum overlap / minimum margin between any pairs of ROIs. This weighted random ROI position selection procedure was developed to demonstrate the capacity of our system to perform fully automatic 2R-SOCT acquisitions.

Once all ROIs were selected for a given slice, the automatic dual-resolution acquisition began. For the OCM acquisitions, the sample was first moved to its 3X ROI Cartesian position and a small volume with the same 40X OCM ROI field of view was acquired. Then, the sample was moved to its corresponding 40X position using the calibrated displacement between the 3X and 40X arms.

The water/tissue interface was found by acquiring multiple low sampling resolution 40X OCT volumes distanced axially by 50 microns. Once the water/tissue interface was located, the initial axial position was set and multiple 40X OCT volumes were acquired within the brain, separated axially by 16 microns. The interference fringe data were recorded on the computer for later offline OCM reconstructions. After the 40X dynamic focusing acquisition, the sample was moved back to the 3X arm and the dual resolution acquisition continued with the other ROIs defined for this slice. The acquisition procedure for the dual-resolution fixed focus mosaics was similar, with the exception that multiple 40X OCT volumes were acquired at a single axial position and that the center of the mosaic was used to find the water/tissue interface for the whole dataset.

The high-resolution OCM volumes were assembled from the sequences of OCT volumes acquired at multiple sample heights. The OCT volumes were blended together using the Gabor-based fusion methodology (Rolland et al., 2010). Briefly, all OCT volumes were computed from the recorded interference fringes using the reconstruction method presented in section 5.2.3. The third OCT volume in a given dynamic-focusing dataset was used to extract the focal plane shape. The focal plane axial position for each A-Line was estimated by finding the maximum signal of the volume convolved with the derivative of a 2D Gaussian, and by fitting a quadratic equation on this extracted focal profile. For every OCT volume the fitted focal plane was shifted axially and the axial position associated with the maximum correlation between the shifted focal plane and the intersected voxel intensities was chosen as the focal plane height. Finally, the OCM volume was assembled by computing trapezoidal-shaped blending weights using the detected focal plane for each OCT volume. The reconstruction was performed at a sampling resolution of 1.5 microns/pixel. Due to the small wavelength bandwidth of the swept-source laser, the axial resolution was much lower than the lateral resolution, limiting the subsequent OCM image analyses to 2D *en face* planes only. The use of a different acquisition laser, modification of the OCT reconstruction model or other post-processing techniques could reduce this resolution anisotropy.

### 5.2.6 Multimodal and Multiresolution Registration

The precise alignment of the OCT and dMRI data is crucial in order to compare these imaging modalities. In previous works (Castonguay et al., 2018; Joël Lefebvre, Castonguay, & Lesage, 2017b; Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017), we developed a multimodal registration procedure to map the assembled 3X OCT brains onto MRI images acquired on the same *ex vivo*

samples prior to serial histology. This multimodal registration technique required intermediate registration templates for each imaging modality (dMRI and OCT) as represented in Figure 5.2. Both registration templates were further aligned to the Allen mouse brain common coordinate framework (Allen Institute, 2015) (CCF) for brain structure identification. Each volume registration step was performed with a series of rigid and affine transformations, and by using the mutual information as a similarity metric. The ANTs tools were utilized to perform all registrations. The MRI registration template was the publicly available 40 microns DSURQE T2-weighted MRI *ex vivo* mouse brain atlas originally published by (Dorr et al., 2008) from the Mouse Imaging Center (MICE). The first b0 volume acquired during the dMRI session was used to perform the registration, and then transformations were applied to each b-value within the diffusion weighted image. For the 3X OCT brain, the registration template was a 25 microns mouse brain template published previously by our group (Joël Lefebvre, Castonguay, & Lesage, 2017a; Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017).

Multiresolution and multimodal stereotactic correspondence, or the precise positioning of the OCM volumes within the dMRI mouse brain, was obtained by a combination of acquisition-related procedures and post-acquisition registration techniques described in Appendix A.

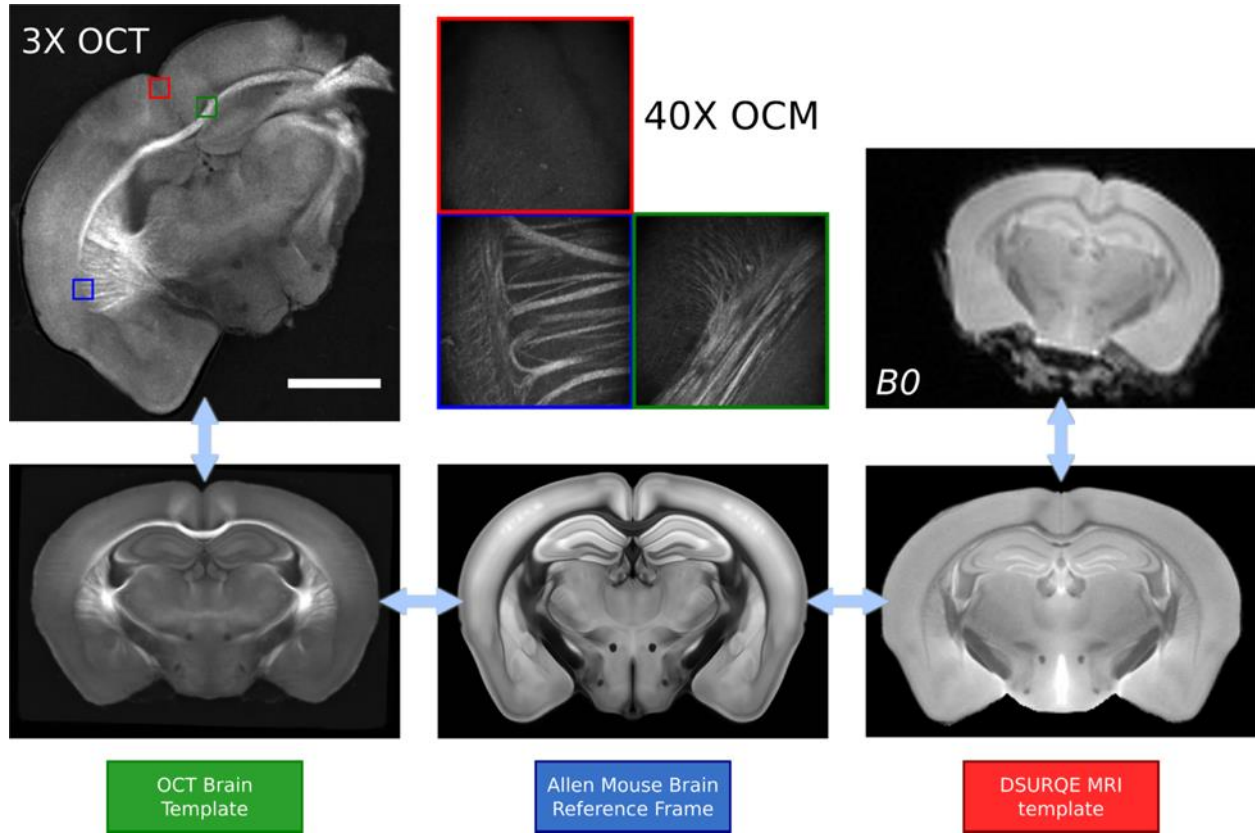


Figure 5.2 Multimodal and multiresolution coregistration workflow. In this illustration, all templates are shown at a resolution of 25 microns, the 3X OCT slice is at a resolution of 15 microns, the 40X OCM images are at a resolution of 1 micron and the FA map is shown at a resolution of 125 microns.

### 5.2.7 Multimodal Signal Comparison

The last part of this methodology was to compare the 40X OCM images with the dMRI data measured in the same brains prior to the automated histology (Figure 5.3). The goal was to demonstrate the capability of the 2R-SOCT imaging pipeline to perform multimodal and multiresolution studies. First, the average dMRI metrics associated with each 40X ROI was measured using the ROI overlay volumes that were registered to the MRI data. The average was performed over all the dMRI voxels encompassed by each 40X ROI. Secondly, the ROI overlay volume was coregistered to the Allen mouse brain common coordinate framework (Allen Institute, 2015). All brain structures within the 40X ROIs were thus extracted from the Allen mouse brain atlas (Lein et al., 2007). The first ontological level in this atlas is separated into: (1) Basic cell groups and regions, (2) fiber tracts, and (3) ventricular systems. For the purpose of this

demonstration, all ROIs containing at least one structure classified within the “fiber tracts” ontological category were selected. Finally, this subset of the 40X ROIs was further separated based upon their dMRI metric average values. The ROIs were separated into 4 groups, using the 25%, 50%, and 75% quantiles of their associated dMRI metric as group discriminators. This was performed for the fractional anisotropy (FA), the number of fiber orientations (NuFO), the maximum of the apparent fiber density (AFD\_MAX), the NODDI orientation dispersion index (OD) and the NODDI intracellular volume fraction (IC\_VF). The 40X images classified with this multimodal and atlas-based selection criteria were finally inspected to assert if they exhibit brain structures commonly associated with low (<25% quantile) and high (>75% quantile) values of each of these dMRI metrics. Finally, a few image features were computed within the 40X ROIs (average and standard deviation of reflectivity and attenuation). These features were categorized within each pair of low / high dMRI metrics and were compared in a quantitative way using Student’s t-tests.

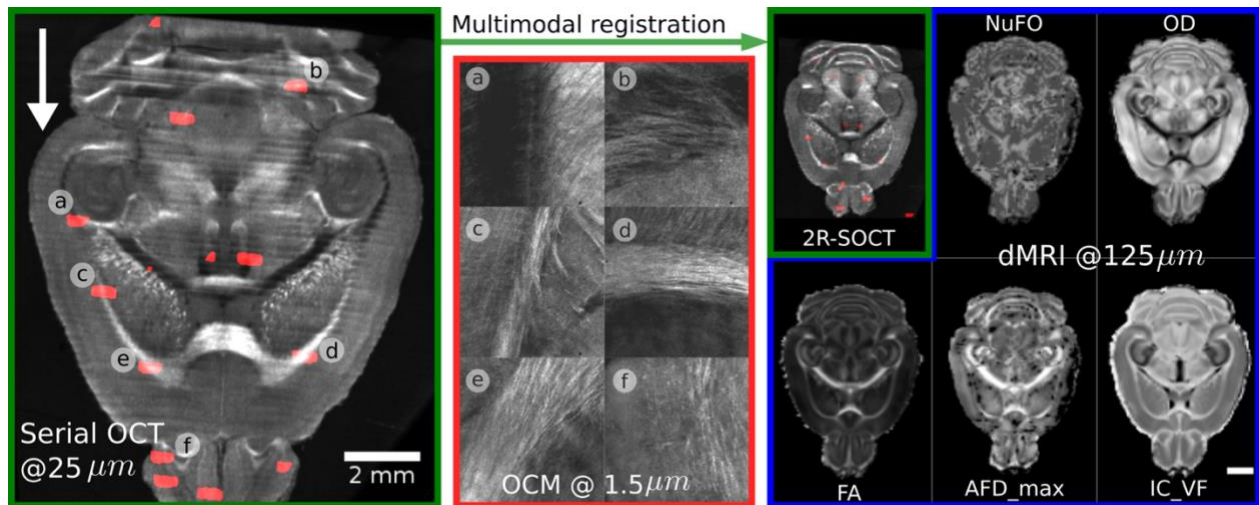


Figure 5.3 Multimodal signal comparison performed between the 2R-SOCT and the dMRI data. The 3X SOCT (Green) is used to image a whole mouse brain that serves as a stereotactic reference to locate the 40X ROIs (red) within the dMRI volumes (blue). Scale bar: 2mm.

## 5.3 Results

### 5.3.1 2R-SOCT Imaging System Characterization

The axial and lateral resolutions of the dual-resolution serial OCT system were measured using an USAF1951 resolution target (Thorlabs, R1L1S1N) and an OCT calibration phantom (Arden Photonics, APL - OP01). All measurements were done in water (Figure 5.4). For the 3X arm characterization, the PSF pattern of the OCT phantom was imaged. The location of all points within an average b-scan was found and a 2D Gaussian profile was fitted on each of the PSFs. Using this method, the average lateral and axial resolutions of the 3X arms were  $r_{xy} = 17.5 \mu m$  and  $r_z = 12 \mu m$ . This is consistent with the resolution estimated with the USAF1951 resolution target using the 10/90 criteria and the last visible group element method (G5E6,  $r_{xy} = 17.54 \mu m$ ). The lateral resolution of the 40X arm was measured using the resolution target only, because the engraving width given by the manufacturer of the OCT phantom ( $d < 2$  microns) is larger than the OCT 40X resolution. The measured lateral resolution of the 40X arm was  $r_{xy} = 1.3 \mu m$ . The axial resolution of the 40X arm ( $r_z = 7 \mu m$ ) was estimated by moving a mirror along the Z direction and by measuring the FWHM of the intensity peak around the focus. To calibrate the automatic translation between the 3X and 40X arms, the concentric circles of the resolution target were used.

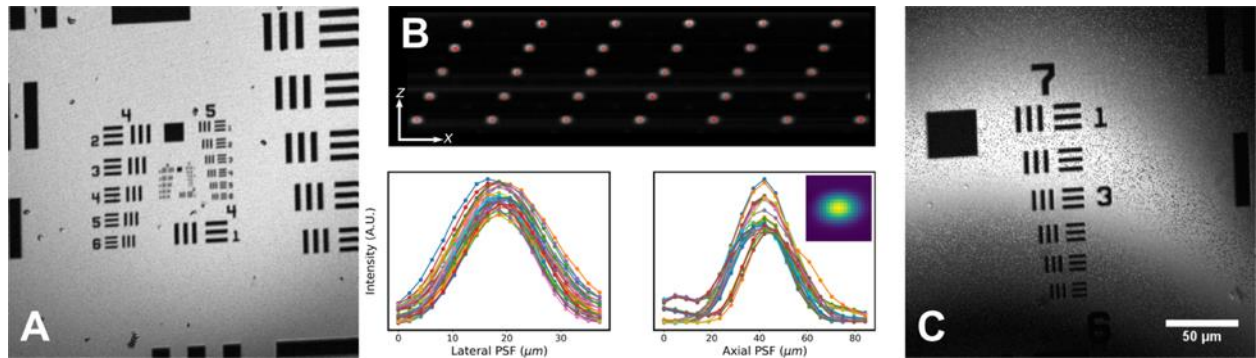


Figure 5.4 Dual resolution OCT characterization. (A) USAF1951 resolution target measured with the 3X arm. The last visible group element was G5E6. (B) Average b-scan of the OCT phantom PSF pattern. The red dots indicate the position of the detected PSF. The plots are the lateral and axial PSF profiles extracted from the image and the inset is the fitted PSF. These measures were done with the 3X arm. (C) USAF1951 resolution target measured with the 40X arm. All acquisitions were done in water.



### 5.3.2 Dual-Resolution Acquisitions

An example of a fixed-focus dual-resolution mosaic acquisition is shown in Figure 5.5. The ROI to be imaged was selected manually with a custom GUI using the average intensity projection of the last acquired 3X OCT tissue slice (Figure 5.5A). A 3X OCT mosaic was acquired at the defined ROI position with a sampling resolution of 10 microns (Figure 5.5B). Then, after the calibrated sample translation from the 3X to the 40X arm, the same region was acquired with the 40X objective at a sampling resolution of 1.5 microns (Figure 5.5C). For this example, the raw data was assembled as is without compensating for vignetting effect or applying blending to the overlap areas in order to better illustrate the dual-resolution serial histology mosaicing approach. It shows that the *in situ* motor displacement model allows positioning each tile at their exact Cartesian position in the scanner reference frame, thus removing the need to perform image registration to assemble the data.

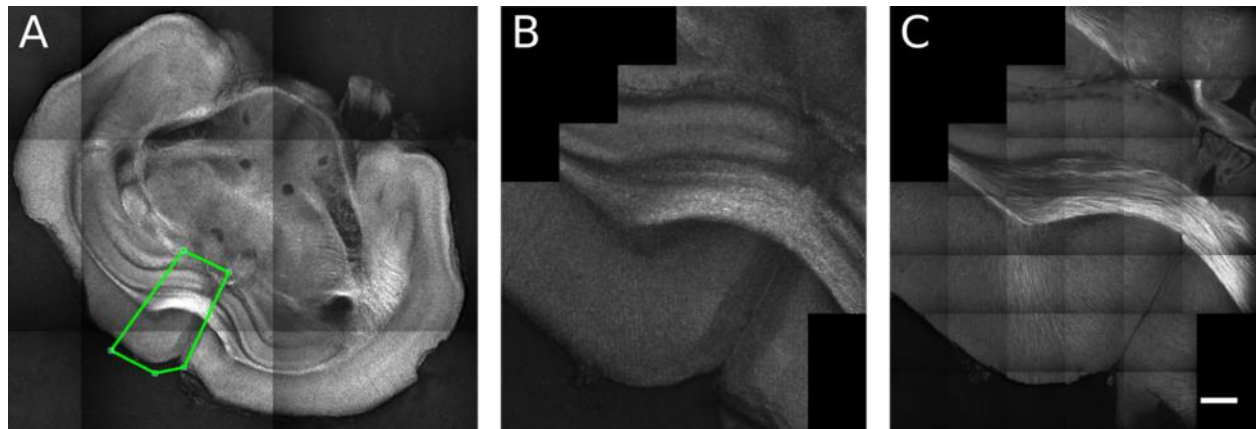


Figure 5.5 Example of a dual resolution fixed-focus mosaic acquisition. (A) Manual selection of the region of interest to be imaged (Green polygon) (B) 3X OCT mosaic acquired at the defined ROI position. (C) Same region acquired with the 40X objective. Each mosaic tiles have a FOV of  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$  and an overlap of 20%. Scale bar: 250 microns.

Individual myelinated fibers appear in the neocortex, as shown in the high-resolution mosaic of Figure 5.5C. Also, larger fiber bundles can be observed in the corpus callosum. It is important to note that due to the orientation dependent OCT contrast of myelinated fibers (Leahy et al., 2013; Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017), only the fibers that are orthogonal to the laser beam optical axis will appear bright in these images. Fibers that are parallel to the optical axis exhibit a dark contrast (e.g. the mammillothalamic tracts in the 3X mosaic or the cingulum bundle

in the 40X mosaic of Figure 5.5). Another source of OCT contrast in gray matter was hypothesized to be the neurite density, as defined by the ratio of neuronal cell bodies to neurites (myelinated axons and dendrites) (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017; Srinivasan et al., 2012). This may be responsible for the visible structures in the neocortex or the hippocampus of the 40X mosaic. The ventricles and vessels appear in the *ex vivo* OCT images as dark areas. The vessels have a tubular or circular shape based on their orientation with the slicing plane. The microvasculature density could thus be another factor that affects the measured OCT contrast in *ex vivo* brain tissue.

An example of the second type of dual resolution acquisition (dynamic-focusing OCT or OCM) is shown in Figure 5.6 for the corpus callosum. This brain area illustrates fiber bundle characteristics affecting the water diffusion signal analysis in dMRI, such as fiber orientation dispersion, fiber crossing and heterogeneity of fiber density and sizes. All OCM acquisitions exhibited high signal attenuation and a degradation of the lateral PSF with depth. Each OCM acquisition took around 6 minutes to perform all movements, acquire a 3X version of the ROI, find the water-tissue interface and acquire the 40X OCT dataset as raw interference fringe volumes. The offline OCM volume reconstruction took another 5 minutes per ROI. For the first brain in this study, the OCM ROI positions were selected manually, and due to the long acquisition time per dual-resolution position, the number of ROIs was limited to 4-5 areas every 4-5 slices, which extended the acquisition time to about 3-4 days.

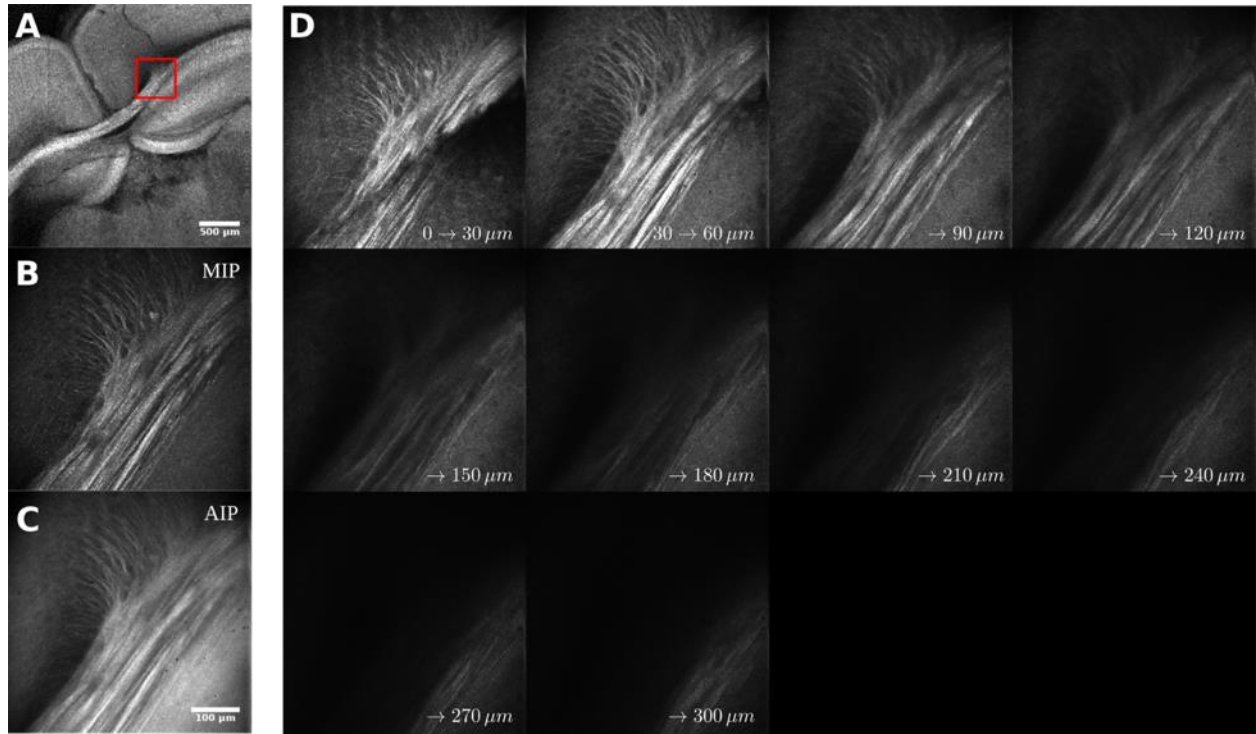


Figure 5.6 Dual resolution OCT acquisition showing the corpus callosum and cingulate bundle in a mouse brain. (A) Low resolution OCT volume used to target the high resolution ROI (red rectangle). (B) Maximum intensity projection and (C) Average intensity projection of the high-resolution OCM volume acquired. (D) Average intensity projections over 30 microns of the OCM volume. The scale bars are of size 0.5 mm for the 3X image and 100 microns for the 40x image.

For the second type of dual-resolution acquisition, the ROI positions could either be selected using the same GUI as for the dual-resolution mosaic images, or they could be generated automatically from the last acquired 3X OCT tissue slice. Figure 5.7 shows the various image processing steps needed to select random ROI positions, as well as a 3D rendering of the 40X ROIs generated for a mouse brain acquired with this method. Each OCM volumes spanned a d of  $0.5 \times 0.5 \times 0.25 \text{ mm}^3$  and were assembled at an isotropic sampling resolution of 1.5 microns using the Gabor-based OCM image fusion method. Figure 5.8 shows the average intensity projections of all dual-resolution ROIs acquired within a single mouse brain. Visual inspection of the ROI AIPs reveals that the 2R-SOCT system and template matching algorithm have successfully associated the 40X OCM volumes to their 3X OCT locations in each mouse brain slices. The difference between a few 3X/40X image pairs is mostly due to an axial range difference between the 3X and 40X AIPs. Indeed, the 3X OCT volume contains tissue from up to 800 microns deep, as of the 40X OCM volume axial range is going from the axial position of the water-tissue interface up to 250 microns

deep. To characterize the ROI positioning accuracy and repeatability of the 2R-SOCT imaging system, a template matching registration was performed using as reference the position chosen by the microscope operator or the position generated by the automated ROI position selection algorithm. Average lateral shifts of  $\Delta x = 24 \pm 31 \mu m$  and  $\Delta y = 142 \pm 72 \mu m$  (mean  $\pm$  std) were measured between the reference and registered ROIs positions. As the template matching was performed at the down sampled 3X OCT mosaic image resolution of 25 microns/pixel, the measured position shift in the X direction corresponds to 1-2 pixels; thus part of the shift can be explained by image discretization. The larger lateral shift in the Y direction could be caused by the way the sample stage is assembled. Indeed, the Y-axis linear stage is mounted on top of the X-axis linear stage and is only supported at its center which acts as a pivot point. When performing a translation between the 3X and 40X objectives, the weight load is transferred from one side to the other of the pivot point. This can introduce minute linear stage displacements that affect principally the y-axis positions. A different XY stage configuration, for example using rail-guided linear stages to offer more support and reduce load-induced deformations, could help to reduce this effect.

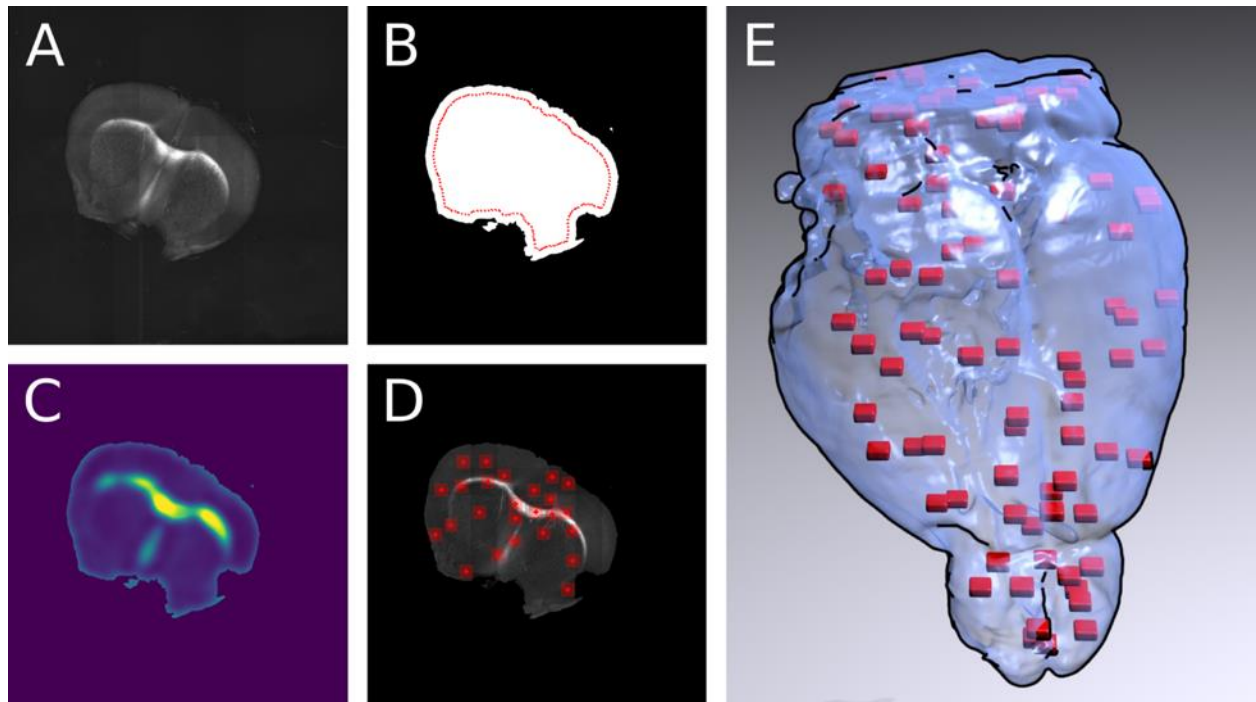


Figure 5.7 Automated 40X OCT ROIs generation method. (A) Average intensity projection of a 3X OCT mouse brain tissue slice, (B) Tissue mask and 0.25mm margin from the Agarose/Tissue boundary (red line), (C) Probability bias used to guide the random ROI generation. (D) 25 ROIs of shape 0.5x0.5mm generated for this slice. (E) 3D rendering of the 40X ROIs (red) generated for an automated 2R-SOCT.

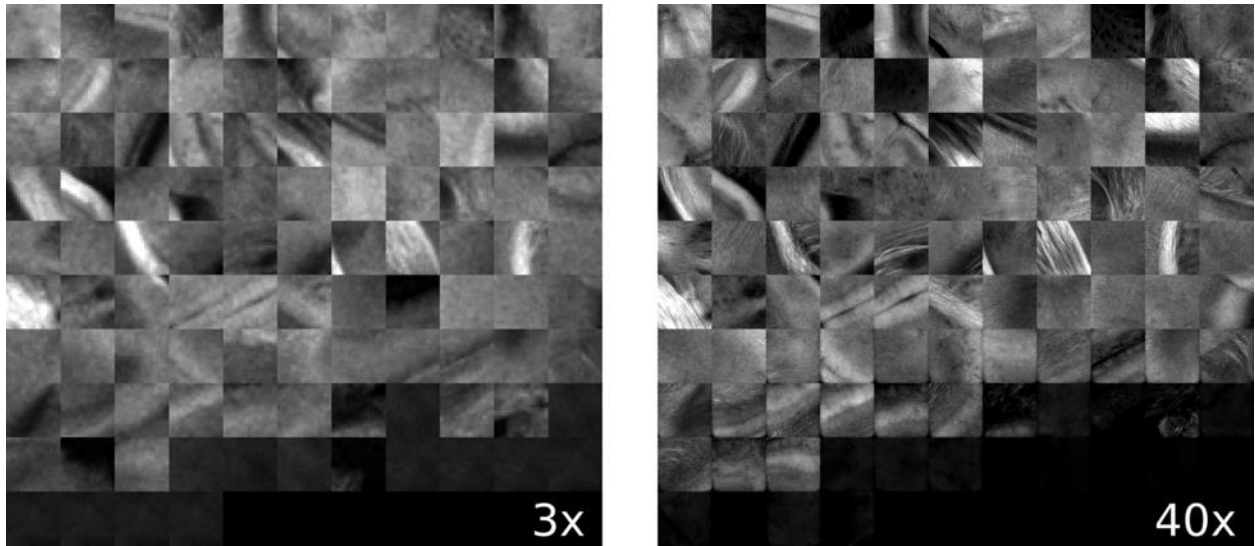


Figure 5.8 Average intensity projections of the dual-resolution ROIs acquired automatically within a single mouse brain. (Left) OCT ROIs acquired with the low-resolution 3X objective and (Right) the same OCM ROIs acquired with the high-resolution 40X objective. Each ROI is of size  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ .

### 5.3.3 Comparison Between the dMRI and 2R-SOCT

A multimodal comparison was performed between the OCM ROIs and the dMRI data. A total of  $n = 250$  ROIs were acquired across three brains. For one brain the ROI positions were chosen manually during the acquisition by the microscope operator, and for the two other mouse brains the ROI positions were selected automatically with the method presented above. A 3D rendering of all ROI 3D FOVs aligned to the Allen mouse brain template is presented in Video 1 (Figure 5.9). As seen in this video, a few ROIs were located outside of the brain, mostly toward the anterior part. This is due to a tissue segmentation error when imaging near the olfactory bulb, thus ROI positions were generated in agarose instead of in the tissue. This problem could be addressed with improved tissue segmentation approaches. Furthermore, after the OCT brain registration onto the Allen mouse brain template, a few ROIs that were acquired in the medulla were outside of the FOV and were thus ignored in the multimodal comparison. Using the Allen mouse brain template, a subset of  $n = 114$  ROIs were selected among all acquired OCM volumes as they intersected at least one fiber tract structure.

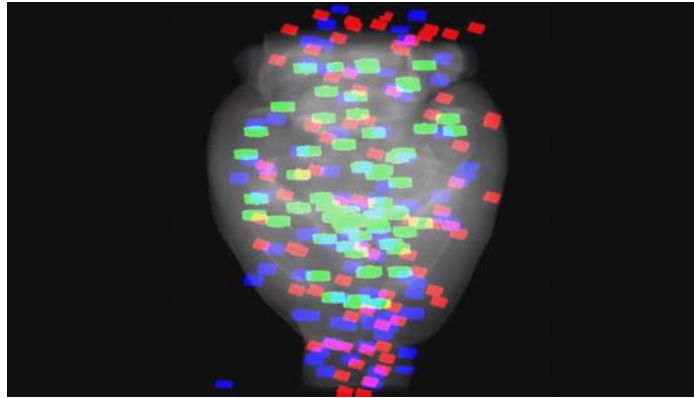


Figure 5.9 3D rendering of all 40X ROIs of this study from three 2R-SOCT mouse brain acquisitions. All ROI overlay volumes were aligned to an OCT mouse brain template, shown here as a grayscale average intensity. The ROI position of the blue and red blocks were selected automatically by the 2R-SOCT ROI selection method, and the green blocks were selected manually by the microscope operator. This is a still frame from the video. (Video1, MP4, 2.2 MB)

For this demonstration, 40X images associated with low and high dMRI metric values are shown in Figure 5.10 for selected examples. The brain structures obtained with the multimodal and atlas-based ROI selection criteria exhibit characteristics that are in accordance with each metric value. First, fractional anisotropy is known to be affected by the presence of crossing fibers, fiber dispersion, fiber bundle density, and by the microstructural architecture of the cellular membranes (A. L. Alexander et al., 2007). For example, a 40X ROI containing the retrosplenial area (RSP) and part of the cingulum bundle (cing) was classified in the low FA group. In this case, the low FA value is due to the low myelin fibers density of this brain area. Indeed, the myelin fibers seen in this ROI have a smaller diameter and are not as tightly packed as the fibers in the fimbria (fi) near the septofimbrial nucleus (SF), which was classified in the high FA group. Secondly, low values of the NuFO metric are associated with fiber tracts and strongly aligned bundles, as shown here in the corpus callosum (cc). On the contrary, high NuFO values are measured in fiber crossings areas. This is observed for example in the gigantocellular reticular nucleus (GRN) as shown in Figure 5.10. Similarly, the AFD\_max is another metric computed from the fiber orientation distribution function and is interpreted as the apparent fiber density within a dMRI voxel. The OCM images classified within the low AFD\_max group show a low density of myelin fibers, as exemplified by the supplemental somatosensory area (SSs) where the external capsule (ec) projects fibers in the cortex. On the opposite, high AFD\_max is an indicator of high fiber density and was associated with the olfactory and temporal limbs of the anterior commissure (aco, act) in this example. The

last two dMRI metrics that were compared with the OCM data are orientation dispersion index (OD) and the intracellular volume fraction (IC\_VF) from the NODDI model. Low orientation dispersion is usually observed in the most coherent white matter as illustrated in Figure 5.10 by the genu of the corpus callosum (ccg). As for the high OD values, the original NODDI publication (Zhang et al., 2012) states that high orientation dispersion is expected in “white matter structures composed of bending and fanning axons [and in] the cerebral cortex and subcortical gray matter structures characterized by sprawling dendritic processes in all directions”. For example, the caudoputamen (CP) near the external capsule (ec) was classified as having high orientation dispersion. Finally, the intracellular volume fraction is an indication of the neurite density as it is related to the water diffusion constrained by the dendrites and neurons. To illustrate, an ROI containing the epithalamus (EPI) and the dentate gyrus molecular (DG-mo) and granule cell (DB-sg) layers were classified within the low IC\_VF group, and an ROI containing 4 different fiber tracts (the superior cerebellar peduncle decussation (dscp), the mammilotegmental tract (mtg), the dorsal tegmental decussation (dtd), and the crossed tectospinal pathway (tspc)), was classified within the high IC\_VF category. This qualitative comparison between the 2R-SOCT data and the dMRI metrics shows that such a new imaging pipeline will enable multiresolution and multimodal studies using small animal brains. Furthermore, by implementing various image processing techniques to analyze the OCM data, such as texture analysis, cell segmentation or fiber diameter / orientation extraction, the 2R-SOCT system will provide additional information that could be used to perform quantitative multimodal validation studies.



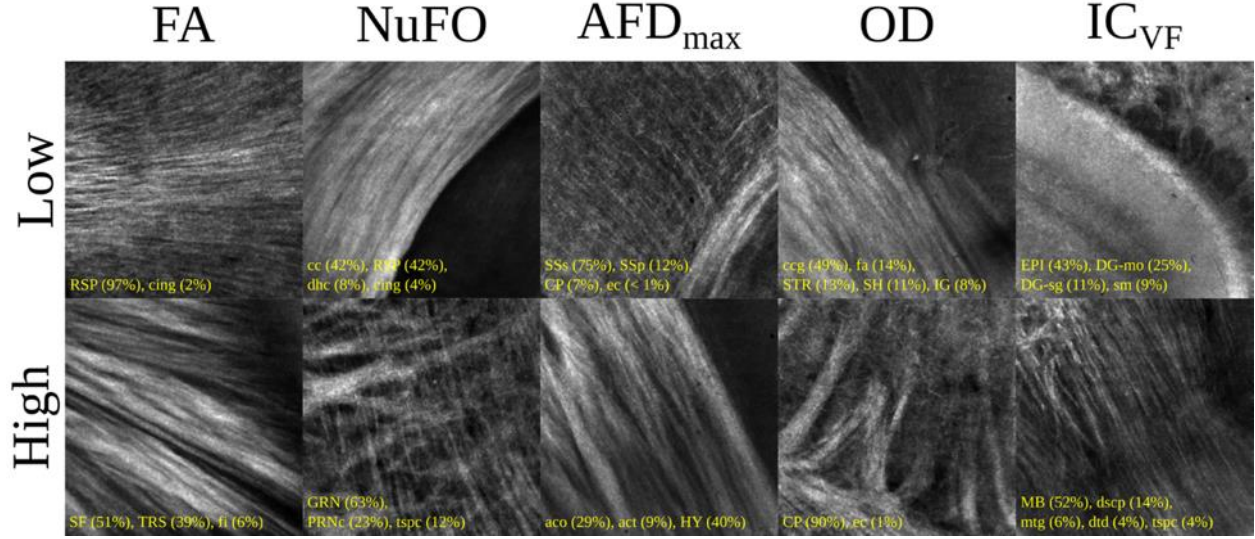


Figure 5.10 Examples of 40X ROIs associated with low and high dMRI metric values. Each image spans a FOV of  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$  and is an average intensity projection over 250 microns. The yellow annotations indicate the brain structures and their volume fraction within the ROIs. The acronyms follow the Allen Mouse Brain convention. (RSP): Retrosplenial Area, (cing): Cingulum Bundle, (SF): Septofimbrial Nucleus, (TRS): Triangular Nucleus of Septum, (fi): Fimbria, (cc): Corpus Callosum, (dhc): Dorsal Hippocampal Commissure, (GRN): Gigantocellular Reticular Nucleus, (PRNc): Pontine Reticular Nucleus, Caudal part, (tscpc): Crossed Tectospinal Pathway, (SSs): Supplemental Somatosensory Area, (SSp): Primary Somatosensory Area, (CP): Caudoputamen, (ec): External Capsule, (aco): Anterior Commissure, olfactory limb, (act): Anterior Commissure, temporal limb, (HY): Hypothalamus, (ccg): Genu of the Corpus Callosum, (fa): Corpus callosum, Anterior Forceps, (STR): Striatum, (SH): Septohippocampal Nucleus, (IG): Induseum Griseum, (EPI): Epithalamus, (DG-mo): Dentate Gyrus - Molecular Layer, (DB-sg): Dentate Gyrus – Granule Cell Layer, (sm): Stria Medullaris, (MB): Midbrain, (dscpc): Superior Cerebellar Peduncle Decussation, (mtg): Mammilotegmental Tract, (dtd): Doral Tegmental Decussation, (tscpc): Crossed Tectospinal Pathway.

A quantitative comparison between the OCM and the dMRI values was performed (Figure 5.11). Image features were extracted from each 40X ROIs AIPs: the average normalized reflectivity  $\langle r_N \rangle$ , the average attenuation coefficient  $\langle \mu \rangle$ , the normalized reflectivity standard deviation  $\sigma_r$ , and the attenuation coefficient standard deviation  $\sigma_\mu$ . The OCM image features associated with each 40X ROI containing at least one fiber tract structure were classified based on the dMRI metric groups computed for the qualitative comparison. For each feature ( $\langle r_N \rangle$ ,  $\langle \mu \rangle$ ,  $\sigma_r$ ,  $\sigma_\mu$ ) and for each pair of low / high dMRI metrics (FA, AFD\_MAX, NuFO, OD, IC\_VF), a T-test was performed with a statistical significance level of  $\alpha = 0.05/n$ , where  $n = 20$  is the Bonferroni correction for multiple comparisons. This revealed that  $\sigma_r$  was significantly higher for the ROIs classified within the



low/high FA groups ( $p < 0.00001$ ), and for the ROIs classified within the low/high AFD\_max groups ( $p < 0.001$ ). A hypothesis to explain this effect is that the presence of a fiber bundle within a 40X ROI increases tissue heterogeneity, thus broadening the OCT reflectivity value range. As the fiber bundle density increases, the overall reflectivity will increase in the FOV because more myelin fibers contribute to photon backscattering. The OCT signal for other dMRI metrics also seems to change between groups, although no statistically significant differences were measured. Some of the changes observed in Figure 5.11 include an increase of  $\langle\mu\rangle$  ( $p=0.02$ ) and  $\sigma_\mu$  ( $p = 0.05$ ) with FA, as well as a reduction of  $\sigma_r$  ( $p=0.02$ ) and  $\langle\mu\rangle$  ( $p=0.04$ ) with OD. A hypothesis to account for the higher attenuation with increases in FA is that as the fiber bundles become more strongly aligned, more myelin fibers are encountered by the photons and each reflection contributes to the sampling beam attenuation. This is consistent with our previous findings in whole mouse brains imaged with SOCT only (Joël Lefebvre, Castonguay, Pouliot, et al., 2017). Furthermore, the reduction of  $\sigma_r$  and  $\langle\mu\rangle$  as the neurite orientation dispersion increases may be linked to myelin sheets and the anisotropic scatterers within the dendrites and axons that redirect the light in more directions, thus the overall reflectivity values range within the 40X ROIs decrease. This tissue thus appears as homogeneous. For gray matter, the neurites are less myelinated thus the tissue reflectivity will also decrease.

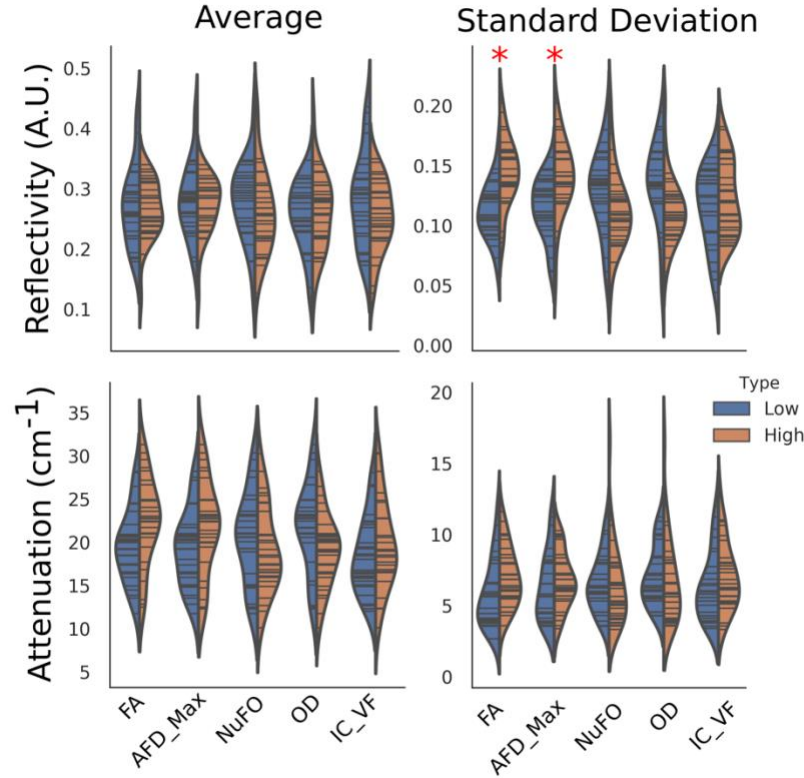


Figure 5.11 Comparison between simple OCM image features and the dMRI metrics. Each histogram represents the OCM values classified within the low (blue) and high (orange) dMRI metric quantiles. The red stars indicate significant differences obtained from a T-test between all pairs of Low/High metric values, corrected for multiple comparisons ( $p < 0.0025$ ).

## 5.4 Discussion

A few design choices of the 2R-SOCT system introduced limitations that could be improved in future implementations of similar serial microscopes. First, the same swept-source laser was used for both 3X and 40X arms. The narrow bandwidth ( $\Delta\lambda = 100 \text{ nm}$ ) of the swept-source laser resulted in isotropic sampling for the 3X arm but in a high sampling anisotropy between the axial and lateral directions for the 40X OCM volumes. This anisotropy limits the usefulness of the 3D aspect of the 40X measures due to the poor axial resolution. Using a source with a larger bandwidth or distinct laser sources for each OCT arm could resolve this problem at the expense of increased cost and system complexity. Improving the axial resolution might also be possible by performing axial PSF deconvolution (Ralston et al., 2005) or interferometer synthetic aperture microscopy (Ralston et al., 2007). Another imaging artefact caused by the optical design of the microscope is the focal plane curvature. This was characterized by detecting the water/tissue interface within each

OCM volume and by next decomposing this surface into Zernike polynomials (Barrett & Myers, 2003; Lakshminarayanan & Fleck, 2011)  $Z_j(x, y)$  of index  $j \leq 5$ , thus only considering low order aberrations. Typically, a focal plane depth denivelation of around 70 microns was measured between the center and the FOV boundary. For all OCM volumes, the field curvature geometry was near-spherical. Indeed, the three largest Zernike coefficients were, in decreasing order of their absolute normalized amplitude, the piston term  $Z_0$  ( $|c_0| = 0.5$ ), the defocus term  $Z_4$  ( $|c_4| = 0.26$ ) and the vertical astigmatism term  $Z_5$  ( $|c_5| = 0.19$ ). The defocus term is a consequence of the large galvanometric mirror scanning angles necessary to get a lateral FOV of 0.5mm with the 40X objective. The vertical astigmatism is caused by the two 45° mirrors used to guide the sampling beam toward the 40X arm and by the scan-induced delay (Ahsen et al., 2013). A different optical design, smaller lateral FOVs, the use of a lower magnitude objective or an inline scan-induced delay compensation method could help to diminish this deformation.

The acquisition time for a single low-resolution slice was approximately 5 minutes for a  $4 \times 3$  mosaic of  $5 \times 5 \times 2.5 \text{ mm}^3$  volumetric OCT tiles with 20% overlap. If no additional dual-resolution acquisition is performed, this amounts to a total of about 5.5 hours per brain. The serial histology acquisition takes an approximate 15 seconds per tile, and 2 minutes to move the samples to the vibratome blade and cut a tissue slice. For the 3X mosaic, the limiting factor for the acquisition time is the in-line OCT volume reconstruction. Indeed, the acquisition code is single-threaded which means that the volume has to be assembled before the next tile can be acquired. Using a different acquisition strategy (e.g. save the data directly on disk without reconstruction, reconstruction in a different thread or using a dedicated image processing server), the acquisition time per tile could be reduced to 6 seconds (whole brain in about 3 hours), which would now be limited by the swept-source laser sweep rate. Moreover, a different vibratome geometry and sample stage movement optimization could further reduce the tissue cutting time. This would reduce significantly the acquisition time when performing multiple subject studies, and it would also be beneficial for larger sample acquisitions. To further accelerate the serial histology procedure, faster swept-source lasers could be employed, or the raster scan design could be replaced by a full-field OCT configuration. The 40X OCM acquisition procedure was another factor that significantly increased the imaging time. Indeed, whole volumetric scans were performed for each focus depth within the tissue, despite the fact that most signal originates from the vicinity of the focal plane due to the small depth-of-field of the 40X objective. The acquisition of the volumetric interference

fringes is a consequence of the FD-OCM acquisition scheme. Furthermore, the OCM acquisition speed was slower due to the depth scanning method, which consisted in adjusting the depth of sample holder for each 40X OCT volumes. Different acquisition strategies, such as reconstruction using GPUs, Gabor fusion master-slave OCT (Cernat et al., 2017) or dynamic focusing objective lens for axial scanning (Murali & Rolland, 2007) could help to reduce the time required to obtain OCM volumes.

For this demonstration of the 2R-SOCT imaging pipeline, the dual resolution ROIs were either selected manually by the operator during the acquisition or in a fully automated way by employing a ROI selection algorithm. The manual selection method is useful to target specific brain areas and to investigate at high resolution particular details observed during the serial histology acquisition. As for the automated ROI selection strategy, it offers the advantage of eliminating operator bias in the ROI positions, and it diminishes the total acquisition time as no user interaction is required, thus allowing for more dual-resolution ROIs to be acquired during an imaging session. Furthermore, the probability maps used to guide the random position selection can be adapted to use various image features and thus provide an additional degree of freedom during experimental design. In future work, this automatic ROI selection methodology could be combined with an *in situ* slice-to-volume registration procedure (Ferrante & Paragios, 2017) to an OCT mouse brain template. Using such a strategy could allow fully automated dual-resolution serial OCT protocols adapted to various experimental designs, such as automatic validation of dMRI in preselected fiber crossing areas, automatic multimodal studies with ROIs generated from user-defined segmentation of the OCT mouse brain template prior to the serial histology procedure, or acquisitions guided by previously computed statistical parametric maps obtained from another imaging modality.

Upon inspection of the brain structures associated with each ROI, it appears that each structure's volume fraction is often lower than could be anticipated when observing the 40X ROI AIPs. For example, in Figure 5.10 the ROI associated with a high AFD\_max value seems to mostly contain the olfactory limb of the anterior commissure (aco), but this fiber tract only amounts to 29% of this ROI volume fraction. This can be explained as follows. First, the volume fractions were computed from the atlas labels contained within each 3D ROI FOV coregistered to the Allen mouse brain template. Any registration errors can thus impact the structure volume fractions. The registration was performed with a series of rigid and affine transforms only, thus smaller local morphological differences between the mouse brains and the template were not compensated. Another explanation

for this volume fraction discrepancy is the image deformations and artefacts present in the 40X data. Indeed, the focal plane curvature, the presence of water above the tissue in the assembled OCM volumes and the OCM reconstruction method itself can all reduce the effective axial FOV of the 40X ROIs, thus some structures that were intersected by the ideal 40X FOV might not be present in the effective FOV. Last, this visual discrepancy between the reported volume fractions and the structures visible in the AIPs might only be a consequence of the 2D representation of a 3D FOV.

The larger size of the 40X ROI FOVs (0.5 mm) compared to the dMRI voxel size (0.125 mm) had for consequence that the average dMRI metrics per ROIs were affected by partial volume effects. For example, the maximum FA value measured for an ROI containing a fiber tract was 0.58. One option to reduce this effect in future investigations with the 2R-SOCT would be to split the ROIs into subvolumes of 125 microns prior to multimodal comparisons. A drawback of smaller ROIs is an increase sensitivity to data misalignment and registration errors, which in turn would increase the need to include non-linear deformations into the multimodal registration pipeline. Finally, the naïve comparison of simple OCM image features with dMRI was shown to be limited. There was a lot of cross talks between each dMRI groups, and the statistical significance was low. The use of more complex image processing techniques, for example to extract information about the fiber volume fractions, fiber density, or orientation, could provide more information about the tissue microstructure in future dMRI validation studies with the 2R-SOCT platform. Nonetheless, the qualitative comparisons have shown that the novel 2R-SOCT imaging pipeline is able to target specific area in the brain and that the high resolution ROIs can be located with good precision within diffusion MRI data.

## 5.5 Conclusion

A novel dual-resolution serial OCT imaging system was developed. The low resolution OCT volumes acquired with a 3X objective were used to image whole mouse brains. The high-resolution OCM volumes acquired with the 40X objective were able to resolve individual myelinated fibers and other brain tissue structures. Moreover, the 2R-SOCT data were coregistered to dMRI data acquired for the same mouse brains prior to histology. This fully automated dual-resolution serial histology pipeline was used in a qualitative validation example, revealing the correspondence between various dMRI metrics and fiber architecture. Our new imaging pipeline demonstrates the

usefulness of this imaging modality to perform multimodal validation studies, and opens the way to new interesting applications, such as small animal neuropathology multimodal cross-sectional studies. Finally, the 2R-SOCT imaging pipeline presented is not limited to OCT and OCM. Indeed, any imaging modality could be used in the second arm, provided that the optical elements are adapted to the wavelength and type of signal to be measured. Such a dual-modality serial OCT scanner could be used for example to evaluate colocalization in whole mouse brains of the microvasculature changes measured with a two-photon fluorescence microscopy, with the white matter distribution mapped with the SOCT.

### Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

### Acknowledgements

We thank Alexandre Castonguay for his work on the first iteration of the serial histology system and his experience with samples preparation for both the MRI acquisition and the serial histology. This work was supported by a Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT) to J. Lefebvre, by CIHR to F. Lesage, by NSERC Discovery Grant program, as well as the institutional Université de Sherbrooke Research Chair in Neuroinformatics to M. Descoteaux and by an NSERC Discovery Grant, RGPIN-2014-06089 to P. Pouliot

## 5.6 References

- Ahsen, O. O., Tao, Y. K., Potsaid, B. M., Sheikine, Y., Jiang, J., Grulkowski, I., ... Fujimoto, J. G. (2013). Swept source optical coherence microscopy using a 1310 nm VCSEL light source. *Optics Express*, 21(15), 18021. <https://doi.org/10.1364/OE.21.018021>
- Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., & Field, A. S. (2007). Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*, 4(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>
- Alexander, D. C., Hubbard, P. L., Hall, M. G., Moore, E. A., Ptito, M., Parker, G. J. M., & Dyrby, T. B. (2010). Orientationally invariant indices of axon diameter and density from diffusion MRI. *NeuroImage*, 52(4), 1374–1389. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.05.043>

- Allen Institute for Brain Science. (2016). *Allen mouse common coordinate framework*, Technical Report (Version 2).
- Andersson, J. L. R., & Sotiropoulos, S. N. (2016). An integrated approach to correction for off-resonance effects and subject movement in diffusion MR imaging. *NeuroImage*, 125, 1063–1078. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.10.019>
- Avants, B. B., Yushkevich, P., Pluta, J., Minkoff, D., Korczykowski, M., Detre, J., & Gee, J. C. (2010). The optimal template effect in hippocampus studies of diseased populations. *NeuroImage*, 49(3), 2457–2466. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.062>
- Avants, B. B., Tustison, N. J., Wu, J., Cook, P. a., & Gee, J. C. (2011). An open source multivariate framework for n-tissue segmentation with evaluation on public data. *Neuroinformatics*, 9(4), 381–400. <https://doi.org/10.1007/s12021-011-9109-y>
- Avants, B. B. (2017). Advanced normalization tools (ANTs). Github Repository. (Version v2.1.0-789-g0740f91). <https://github.com/stnava/ANTs>
- Barrett, H. H., & Myers, K. J. (2003). *Foundations of Image Science* (1st ed.). Wiley-Interscience.
- Ben Arous, J. (2011). Single myelin fiber imaging in living rodents without labeling by deep optical coherence microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 16(11), 116012. <https://doi.org/10.1117/1.3650770>
- Calabrese, E., Badea, A., Cofer, G., Qi, Y., & Johnson, G. A. (2015). A Diffusion MRI Tractography Connectome of the Mouse Brain and Comparison with Neuronal Tracer Data. *Cerebral Cortex*, 25(11), 4628–4637. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv121>
- Caruyer, E., Lenglet, C., Sapiro, G., & Deriche, R. (2013). Design of multishell sampling schemes with uniform coverage in diffusion MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 69(6), 1534–1540. <https://doi.org/10.1002/mrm.24736>

- Castonguay, A., Lefebvre, J., Pouliot, P., Avti, P., Moeini, M., & Lesage, F. (2017). Serial optical coherence scanning reveals an association between cardiac function and the heart architecture in the aging rodent heart. *Biomedical Optics Express*, 8(11), 5027. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.005027>
- Castonguay, A., Lefebvre, J., Lesage, F., & Pouliot, P. (2018). Comparing three-dimensional serial optical coherence tomography histology to MRI imaging in the entire mouse brain. *Journal of Biomedical Optics*, 23(01), 1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.1.016008>
- Cernat, R., Bradu, A., Israelsen, N. M., Bang, O., Rivet, S., Keane, P. A., ... Podoleanu, A. (2017). Gabor fusion master slave optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 8(2), 813. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.000813>
- Daducci, A., Canales-Rodríguez, E. J., Zhang, H., Dyrby, T. B., Alexander, D. C., & Thiran, J.-P. (2015). Accelerated Microstructure Imaging via Convex Optimization (AMICO) from diffusion MRI data. *NeuroImage*, 105, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.10.026>
- Delafontaine-Martel, P., Lefebvre, J., Tardif, P.-L., Lévy, B. I., Pouliot, P., & Lesage, F. (2018). Whole brain vascular imaging in a mouse model of Alzheimer's disease with two-photon microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 23(07), 1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.076501>
- Dell'Acqua, F., & Catani, M. (2012). Structural human brain networks. *Current Opinion in Neurology*, 1. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328355d544>
- Dell'Acqua, F., Simmons, A., Williams, S. C. R., & Catani, M. (2013). Can spherical deconvolution provide more information than fiber orientations? Hindrance modulated orientational anisotropy, a true-tract specific index to characterize white matter diffusion. *Human Brain Mapping*, 34(10), 2464–2483. <https://doi.org/10.1002/hbm.22080>
- Descoteaux, M., Wiest-Daesslé, N., Prima, S., Barillot, C., & Deriche, R. (2008). Impact of Rician Adapted Non-Local Means Filtering on HARDI (pp. 122–130). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85990-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85990-1_15)



- Descoteaux, M., Deriche, R., Knösche, T. R., & Anwander, A. (2009). Deterministic and probabilistic tractography based on complex fibre orientation distributions. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 28(2), 269–286.  
<https://doi.org/10.1109/TMI.2008.2004424>
- Dorr, A. E., Lerch, J. P., Spring, S., Kabani, N., & Henkelman, R. M. (2008). High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *NeuroImage*, 42(1), 60–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.03.037>
- Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robbin, J.-C., Pujol, S., ... Kikinis, R. (2012). 3D slicers as an image computing platform for thw quantitative imaging network. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(9), 1323–1341.  
<https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.05.001.3D>
- Ferrante, E., & Paragios, N. (2017). Slice-to-volume medical image registration: A survey. *Medical Image Analysis*, 39, 101–123. <https://doi.org/10.1016/j.media.2017.04.010>
- Fu, Y., Huff, T. B., Wang, H.-W., Cheng, J.-X., & Wang, H. (2008). Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Express*, 16(24), 19396. <https://doi.org/10.1364/OE.16.019396>
- Garyfallidis, E., Brett, M., Amirbekian, B., Rokem, A., van der Walt, S., Descoteaux, M., & Nimmo-Smith, I. (2014). Dipy, a library for the analysis of diffusion MRI data. *Frontiers in Neuroinformatics*, 8. <https://doi.org/10.3389/fninf.2014.00008>
- Gorgolewski, K., Burns, C. D., Madison, C., Clark, D., Halchenko, Y. O., Waskom, M. L., & Ghosh, S. S. (2011). Nipype: A Flexible, Lightweight and Extensible Neuroimaging Data Processing Framework in Python. *Frontiers in Neuroinformatics*, 5(August).  
<https://doi.org/10.3389/fninf.2011.00013>
- Jones, P. W. (1999). First- and Second-Order Conservative Remapping Schemes for Grids in Spherical Coordinates. *Monthly Weather Review*. [https://doi.org/10.1175/1520-0493\(1999\)127<2204:FASOCR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1999)127<2204:FASOCR>2.0.CO;2)

- Khan, A. R., Cornea, A., Leigland, L. A., Kohama, S. G., Jespersen, S. N., & Kroenke, C. D. (2015). 3D structure tensor analysis of light microscopy data for validating diffusion MRI. *NeuroImage*, 111, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.01.061>
- Kleinfeld, D., Bharioke, A., Blinder, P., Bock, D. D., Briggman, K. L., Chklovskii, D. B., ... Sakmann, B. (2011). Large-Scale Automated Histology in the Pursuit of Connectomes. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16125–16138. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4077-11.2011>
- Kremer, A., Lippens, S., Bartunkova, S., Aseelbergh, B., Blanplain, C., Fendrych, M., ... Guérin, C. J. (2015). Developing 3D SEM in a broad biological context. *Journal of Microscopy*, 259(2), 80–96. <https://doi.org/10.1111/jmi.12211>
- Lakshminarayanan, V., & Fleck, A. (2011). Zernike polynomials: a guide. *Journal of Modern Optics*, 58(7), 545–561. <https://doi.org/10.1080/09500340.2011.554896>
- Leahy, C., Radhakrishnan, H., & Srinivasan, V. J. (2013). Volumetric imaging and quantification of cytoarchitecture and myeloarchitecture with intrinsic scattering contrast. *Biomedical Optics Express*, 4(10), 1913–1978. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001978>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., & Lesage, F. (2017). White matter segmentation by estimating tissue optical attenuation from volumetric OCT massive histology of whole rodent brains. In T. G. Brown, C. J. Cogswell, & T. Wilson (Eds.), *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* (Vol. 10070, p. 1007012). <https://doi.org/10.1117/12.2251173>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., & Lesage, F. (2017). OCT Mouse Brain Templates. Mendeley Data. <https://doi.org/10.17632/33wfgxpmp8.1>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., Pouliot, P., Descoteaux, M., & Lesage, F. (2017). Whole mouse brain imaging using optical coherence tomography: reconstruction, normalization, segmentation, and comparison with diffusion MRI. *Neurophotonics*, 4(4), 41501. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.4.4.041501>

- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., ... Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168–176. <https://doi.org/10.1038/nature05453>
- Lesage, F., Castonguay, A., Tardif, P. L. L., Lefebvre, J., & Li, B. (2015). Investigating the impact of blood pressure increase to the brain using high resolution serial histology and image processing. In *Wavelets and Sparsity XVI* (Vol. 9597, p. 95970M). San Diego, CA: SPIE Proceedings. <https://doi.org/10.1117/12.2189110>
- Lewis, J. P. (1995). Fast Normalized Cross-Correlation. *Vision Interface*, 95(120123), 15–19. <https://doi.org/10.1007/s00034-009-9130-7>
- Magnain, C., Augustinack, J. C., Reuter, M., Wachinger, C., Frosch, M. P., Ragan, T., ... Fischl, B. (2014). Blockface histology with optical coherence tomography: A comparison with Nissl staining. *NeuroImage*, 84, 524–533. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.072>
- Murali, S., & Rolland, J. (2007). Dynamic-focusing microscope objective for optical coherence tomography. In G. G. Gregory, J. M. Howard, & R. J. Koshel (Eds.) (p. 63420H). <https://doi.org/10.1117/12.692205>
- Oh, S. W., Harris, J. a., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., ... Zeng, H. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>
- Price, D. L., Chow, S. K., MacLean, N. A. B., Hakoziaki, H., Peltier, S., Martone, M. E., & Ellisman, M. H. (2006). High-resolution large-scale mosaic imaging using multiphoton microscopy to characterize transgenic mouse models of human neurological disorders. *Neuroinformatics*, 4(1), 65–80. <https://doi.org/10.1385/NI>
- Raffelt, D., Tournier, J.-D., Rose, S., Ridgway, G. R., Henderson, R., Crozier, S., ... Connelly, A. (2012). Apparent Fibre Density: A novel measure for the analysis of diffusion-weighted magnetic resonance images. *NeuroImage*, 59(4), 3976–3994. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.10.045>

- Ragan, T., Kadiri, L. R., Venkataraju, K. U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., ... Osten, P. (2012). Serial two-photon tomography: an automated method for ex-vivo mouse brain imaging. *Nature Methods*, 9(3), 255–258. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1854>.  
[Serial](https://doi.org/10.1038/nmeth.1854)
- Ralston, T. S., Marks, D. L., Kamalabadi, F., & Boppart, S. A. (2005). Deconvolution methods for mitigation of transverse blurring in optical coherence tomography. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14(9), 1254–1264. <https://doi.org/10.1109/TIP.2005.852469>
- Ralston, T. S., Marks, D. L., Scott Carney, P., & Boppart, S. a. (2007). Interferometric synthetic aperture microscopy. *Nature Physics*, 3(2), 129–134. <https://doi.org/10.1038/nphys514>
- Rolland, J. P., Meemon, P., Murali, S., Thompson, K. P., & Lee, K. (2010). Gabor-based fusion technique for Optical Coherence Microscopy. *Optics Express*, 18(4), 3632. <https://doi.org/10.1364/OE.18.003632>
- Salo, R. A., Belevich, I., Manninen, E., Jokitalo, E., Gröhn, O., & Sierra, A. (2018). Quantification of anisotropy and orientation in 3D electron microscopy and diffusion tensor imaging in injured rat brain. *NeuroImage*, 172(September 2017), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.01.087>
- Srinivasan, V. J., Radhakrishnan, H., Jiang, J. Y., Barry, S., & Cable, A. E. (2012). Optical coherence microscopy for deep tissue imaging of the cerebral cortex with intrinsic contrast. *Optics Express*, 20(3), 2220. <https://doi.org/10.1364/OE.20.002220>
- Tardif, P. L., Bertrand, M. J., Abran, M., Castonguay, A., Lefebvre, J., St?hli, B. E., ... Lesage, F. (2016). Validating intravascular imaging with serial optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17122110>
- Tournier, J.-D., Calamante, F., & Connelly, A. (2007). Robust determination of the fibre orientation distribution in diffusion MRI: Non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. *NeuroImage*, 35(4), 1459–1472. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.016>

- Tustison, N. J., Avants, B. B., Cook, P. a, Yuanjie Zheng, Egan, A., Yushkevich, P. a, & Gee, J. C. (2010). N4ITK: Improved N3 Bias Correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(6), 1310–1320. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2046908>
- Vandenberghe, M. E., Hérard, A.-S., Souedet, N., Sadouni, E., Santin, M. D., Briet, D., ... Delzescaux, T. (2016). High-throughput 3D whole-brain quantitative histopathology in rodents. *Scientific Reports (in Revision)*, (January 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep20958>
- Wang, H., Zhu, J., & Akkin, T. (2014). Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *NeuroImage*, 84, 1007–1017. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.09.063>
- Wang, H., Zhu, J., Reuter, M., Vinke, L. N., Yendiki, A., Boas, D. A., ... Akkin, T. (2014). Cross-validation of serial optical coherence scanning and diffusion tensor imaging: A study on neural fiber maps in human medulla oblongata. *NeuroImage*, 100, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.06.032>
- Wang, H., Lenglet, C., & Akkin, T. (2015). Structure tensor analysis of serial optical coherence scanner images for mapping fiber orientations and tractography in the brain. *Journal of Biomedical Optics*, 20(3), 036003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.3.036003>
- Wang, H., Magnain, C., Sakadžić, S., Fischl, B., Boas, D. A., C Cauberg, E. C., ... Li, X. (2017). Characterizing the optical properties of human brain tissue with high numerical aperture optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 8(12), 5617–5636. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.005617>
- Wang, H., Magnain, C., Wang, R., Dubb, J., Varjabedian, A., Tirrell, L. S., ... Boas, D. A. (2018). as -PSOCT: Volumetric microscopic imaging of human brain architecture and connectivity. *NeuroImage*, 165, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.10.012>
- Wong, T. T. W., Zhang, R., Zhang, C., Hsu, H.-C., Maslov, K. I., Wang, L. V. L., ... Wang, L. V. L. (2017). Label-free automated three-dimensional imaging of whole organs by

microtomy-assisted photoacoustic microscopy. *Nature Communications*, 8(1), 1386.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01649-3>

Zhang, H., Schneider, T., Wheeler-Kingshott, C. A., & Alexander, D. C. (2012). NODDI: Practical in vivo neurite orientation dispersion and density imaging of the human brain. *NeuroImage*, 61(4), 1000–1016. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.072>

## 5.7 Appendices

### 5.7.1 Appendix A: Stereotactic Correspondence between the 3X and 40X OCT

The precise positioning of the OCM volumes within the dMRI mouse brain was obtained by a combination of acquisition-related procedures and post-acquisition registration techniques. First, the motorized sample stage was used to ensure an accurate and consistent correspondence of the 3X and 40X images. Although the linear stages employed for sample displacements possess sub-micron accuracy, the X and Y linear stages were not perfectly orthogonal, thus introducing a deformation when performing mosaics. To compensate this effect, a simple transformation model was developed to characterize the motorized sample stage assembly. This model describes the sample 2D Cartesian positions as a combination of the linear stages microstep positions. The model was:  $\vec{p} = \mathbf{A} \vec{p}_M + \vec{b}$ , where  $\mathbf{A}$  is a  $2 \times 2$  transform matrix,  $\vec{b}$  is a translation vector,  $\vec{p}$  is the 2D Cartesian position and  $\vec{p}_M$  is the microstep position of each linear stage. The transform matrix was calibrated for each linear stage by performing a displacement by predefined number of microsteps, by recording an image at each location and by then extracting the real translation performed between the initial image and the translated one using phase correlation. The linear stage origin location was taken into account by adding a translation  $\vec{b}$ . This model was used to precisely convert linear stage position to 2D Cartesian positions. This accurate position was recorded for each 3X OCT tile, thus eliminating the need to perform pairwise image registration during the data reconstruction.

Another calibration was performed in order to directly relate the images acquired by the 3X and 40X arms of the microscope. Using a resolution target, images of concentric circles were acquired using both the 3X and 40X objectives. The 2D Cartesian coordinate corresponding to each image

position was recorded, and the translation between both arms was measured. Consequently, images acquired with the 40X objective were mapped directly into the assembled 3X OCT brain slices during the 2R-SOCT acquisition process. A second offline registration procedure was employed to validate and refine the ROI positions for the subsequent multimodal comparison. A template matching algorithm (OpenCV) was used to find the lateral 40X ROI positions within an assembled 3X tissue slice. The similarity between the 40X templates and the 3X image patches was assessed with the normalized cross-correlation (Lewis, 1995). This registration procedure was necessary due to positional errors caused by the linear stages when performing large displacements to move the samples from the 3X to the 40X objectives. Next, to be able to locate the 40X ROIs within the assembled 3X brains and the dMRI volumes, an ROI overlay volume was generated. The overlay generation method used the registered 40X lateral positions and the tissue slices positions computed for the 3X OCT whole brain reconstruction. The resulting overlay volumes had the same dimension as the assembled brains, and each ROI was represented by a 3D block of similar FOV and position. Each block was assigned a different label to know which 3D FOV corresponds to which 40X ROI. Finally, to get a stereotactic correspondence between the high resolution 40X ROIs and their MRI counterparts, the affine matrices obtained during the 3X OCT and dMRI brain registration onto the Allen mouse brain were applied sequentially on the 40X ROI overlay volumes.

## CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux réalisés pour cette thèse et présentés dans les articles précédents ont été menés pour atteindre l'objectif général du projet, soit le développement d'un pipeline d'imagerie basée sur l'histologie sérielle par OCT pour réaliser des études de groupes animales multimodales combinant histologie et IRM. D'abord, une méthode de reconstruction des données SOCT a été mise en place afin d'assembler les images qui étaient déjà acquises au sein du laboratoire. En utilisant des outils d'analyse développés pour la neuro-imagerie par IRM, des méthodes de recalage des cerveaux, de calcul d'un cerveau moyen, et de segmentation des tissus ont été adaptées pour être utilisées avec les cerveaux de souris reconstruits. Ces outils ont permis de réaliser une première comparaison entre IRM et OCT. Cette comparaison a confirmé la dépendance du contraste OCT avec l'orientation des fibres de matière blanche, et a indiqué que quelques propriétés structurelles des amas pouvaient influencer le contraste, comme leur densité, le diamètre et le nombre d'orientations des fibres, les croisements de fibres, la proportion de neurites par rapport à la matière grise, etc. En plus de la réflectivité du tissu, le coefficient d'atténuation local a été extrait en adaptant un modèle de diffusion à un seul photon. Ces cartes d'atténuation sont utiles à la fois pour réduire les variations d'intensité avec la profondeur de la réflectivité lors de l'assemblage des données, et aussi comme indicateurs supplémentaires des propriétés des tissus neuronaux. La combinaison de la réflectivité et de l'atténuation a été mise à profit pour classer les tissus en 5 groupes distincts pour le premier article. L'exploitation du ratio entre atténuation et réflectivité pourrait être un indicateur de l'inclinaison des fibres par rapport à l'axe optique du microscope.

L'OCT sériel dans le premier article employait un objectif 3X offrant une résolution quasi isotropique autour de 15 microns par voxel. Afin de distinguer des détails fins de la myéline avec l'OCT, il faut toutefois utiliser une résolution plus petite. Pour tirer profit du pipeline multimodal développé pour le SOCT-3X, le système d'imagerie sériel a été modifié en incluant un second bras OCT à haute résolution. Ainsi, les données à faible résolution ont servi de repère stéréotaxique pour les acquisitions à haute résolution. Un tel système est une solution au compromis qu'il faut inévitablement faire entre résolution et quantité de données lors de la conception d'un système d'histologie massive. Les images acquises par histologie sérielle bi-résolution ont été intégrées au pipeline d'imagerie et de traitement mis en place pour le SOCT. Ainsi, les ROIs 40X ont pu être comparées directement à leur voxel correspondant dans des volumes IRM acquis pour les mêmes cerveaux. Une comparaison sommaire des données, basée sur un atlas et utilisant les métriques



IRMd pour classifier les ROIs 40X, a révélé que les caractéristiques microstructurales des fibres attendues pour chaque métrique IRM étaient bel et bien observées. Ceci confirme le potentiel du système d'histologie bi-résolution par OCT pour réaliser des études multimodales et multirésolution avec plusieurs animaux.

## 6.1 Objectif 1

Le premier objectif spécifique de cette thèse était l'élaboration d'une méthode de reconstruction des données d'histologie sérielle par OCT, et la mise en place d'un pipeline de coregistration pour aligner les cerveaux de souris OCT aux images IRMd. Quelques choix faits au cours de l'élaboration des méthodes de traitement d'images ont des limitations qui pourraient être adressées aux cours de projets avec ce type de données.

Le calcul des positions de chaque image au sein de la mosaïque a soit utilisé un modèle de déplacement des moteurs linéaires du support à échantillon, soit utilisé directement les positions enregistrées par ces moteurs au cours de l'acquisition. Dans les deux cas, le modèle suppose que tous les volumes d'une même tranche de tissu ont été acquis à une hauteur fixe du support à échantillon. Donc, aucune coregistration dans la direction axiale n'est faite et la majorité des calculs pour estimer la translation entre images voisines est réalisée avec une projection 2D des intensités en fonction de la profondeur. Ce choix permet d'accélérer les calculs, et il est justifié parce que pour l'OCT 3X, la grande profondeur de champ ne requiert pas d'ajuster la hauteur du focus dans le tissu pour chaque position au sein de la mosaïque. Toutefois, lorsqu'un objectif à plus grand grossissement est utilisé, il est essentiel d'ajuster la hauteur de l'échantillon pour chaque position latérale. En effet, la profondeur de champ pour les objectifs à grand NA est plus faible. Le modèle de reconstruction pourrait donc être adapté pour considérer les translations axiales lors de la coregistration. Cette modification n'impliquerait pas de modification du modèle de fusion d'images, puisqu'il est déjà développé pour recevoir des positions 3D. En effet, il est utilisé pour assembler les tranches de tissus en 1 seul volume.

En ce qui concerne encore la coregistration des données, le modèle suppose que les positions obtenues par les moteurs linéaires sont précises au micron près et qu'aucune variation aléatoire n'est introduite lors de l'acquisition. Ceci est une hypothèse valable lorsque les données sont assemblées à faible résolution (p.ex. à 25 microns), mais pourrait représenter une limitation pour des reconstructions à plus haute résolution. Un schéma d'optimisation locale des positions, qui

considère le réseau de voisinage (*neighborhood graph*) formé par les images d'une même mosaïque pourrait être ajouté au modèle de calcul des positions pour faire des ajustements sous-micrométriques. Un autre défi d'intérêt pour des acquisitions avec un objectif à plus grand NA consiste en les aberrations optiques et déformations d'images dans ces jeux de données. De plus, la faible longueur de Rayleigh de ces objectifs a pour conséquence qu'une dégradation de la PSF latérale apparaît plus la zone imagée est éloignée du plan focal. Des algorithmes de prétraitement des données, de débruitage et de déconvolution sont essentiels à ajouter au prétraitement des données si un grand NA est utilisé pour acquérir les cerveaux entiers avec le SOCT.

Les cerveaux de souris entiers ont été assemblés à une résolution réduite de 25 microns / voxel, afin de diminuer le temps de calcul, de visualiser les données reconstruites et de faire les coregistrations multimodales en des temps raisonnables. Bien entendu, des méthodes de reconstruction multirésolution seraient un atout important pour l'histologie sérielle afin de pouvoir exploiter l'entièreté des données à leur pleine résolution. Ceci nécessiterait le développement d'un serveur de visualisation similaire à celui utilisé par le Allen Institute qui permet de naviguer à plusieurs résolutions dans les données sans avoir à tout conserver en mémoire. Également, l'utilisation des données SOCT à leur pleine résolution pourrait ouvrir la voie à d'autres types d'analyse autres que les études morphométriques, tel que l'analyse des textures et des patrons de speckles. L'intégration des pipelines d'assemblage à des serveurs de calculs, une fonctionnalité du code développé pour le 1<sup>er</sup> article mais qui n'est pas nécessaire lorsque les données sont assemblées à basse résolution, devient alors essentielle. Un aspect exploré au cours de ce projet, mais qui n'a pas été intégré au pipeline d'imagerie faute de temps et de priorité, est la combinaison des serveurs de données et de reconstruction en un seul serveur. Ce serveur permettrait à la fois de conserver les images acquises par les systèmes d'histologie sérielle, de les assembler, de les coregistrer automatiquement à des cerveaux de références. Il servirait aussi à archiver les multiples expériences réalisées en laboratoire. De plus, la quantité croissante de données générées par les systèmes d'histologie vont nécessiter le développement de méthodes de compression des images efficaces pour l'OCT, tel que la compression par transformée en curvelets (Jian et al., 2010).

Une autre contribution importante au premier objectif de cette thèse est l'intégration du modèle d'atténuation avec la profondeur du tissu pour assembler les données SOCT. Toutefois, ce modèle a quelques défauts. Il suppose que la rétroréflexion est une fraction constante du faisceau atténué. Ceci est une hypothèse valide que pour les tissus homogènes. De plus, le modèle représente les

changements d'interfaces (par exemple tissu/eau, ou tissu/CSF) par des zones de grande atténuation. Une amélioration du modèle pour considérer ces limitations serait utile. Une façon de compléter le modèle d'atténuation actuel serait d'exploiter les images des mêmes tissus acquis à plusieurs profondeurs. En effet, les données SOCT 3X sont en mesure d'imager plus profondément dans le tissu que les 200 microns conservés par la reconstruction. Il serait donc possible d'extraire de l'information sur la diffusion multiple dans les zones de tissus profondes. Une autre information qui pourrait être extraite des données OCT est l'orientation locale de la texture. L'article 1 montre que la dépendance entre réflectivité, atténuation et orientation de la matière blanche pourrait être utilisée pour extraire l'inclinaison des amas de fibres par rapport à l'axe optique du microscope. Ceci permettrait de calculer des cartes d'orientation de fibres pour les jeux de données SOCT existants.

## 6.2 Objectif 2

Le second objectif spécifique de cette thèse était le développement d'un OCT bi-résolution intégré au système d'histologie sériel déjà en place. Ceci a été fait une fois le pipeline de reconstruction et de coregistration développé pour le SOCT. Afin de profiter du système OCT existant, l'OCM a été conçu pour utiliser le même laser à balayage et le même système de miroirs galvanométriques. D'autres configurations auraient toutefois été possibles. En conservant la même source laser, le système aurait pu utiliser un commutateur optique fibré pour diriger la lumière vers deux systèmes de miroirs galvanométriques et deux télescopes distincts sans nécessité de déviation du faisceau par des miroirs 45°. Un avantage de cette configuration est la simplification de l'alignement optique, mais la lumière récoltée contiendrait du signal parasite provenant des 2 bras de l'OCT. Une autre configuration utiliserait un changeur d'objectif motorisé. Ce système doit toutefois utiliser le même télescope pour tous les objectifs présents dans le dispositif, donc il faudrait s'assurer que les conditions d'utilisation de chaque objectif soient les mêmes, peu importe leur grossissement. Ces composants optomécaniques nécessitent aussi un plus grand espace physique, ce qui n'est pas compatible avec le bassin d'immersion utilisé pour l'histologie massive. Le système aurait pu encore être conçu en utilisant deux sources de lumière différentes. Par exemple, une diode super lumineuse à grande largeur de bande aurait pu être utilisée dans le second bras, offrant une meilleure résolution axiale pour l'OCM. La configuration à 2 sources offre la possibilité d'utiliser une modalité optique différente, telle que la microscopie confocale, la microscopie à

fluorescence 2-photons ou la microscopie Raman, au détriment d'une augmentation de la complexité du système optique.

Le grand grossissement de l'objectif sélectionné (40X) a permis d'obtenir une résolution latérale d'environ 1.3 micron; la profondeur de champ du microscope était d'environ 8 microns. Cette résolution anisotrope a pour conséquence que seules des projections 2D des données 40X ont été exploitées lors des comparaisons de l'OCM avec l'IRM. Ceci limite en effet la capacité de détecter les fibres de myélines individuelles en 3D ou les corps cellulaires des neurones. Pour obtenir une résolution isotrope, il serait nécessaire de remplacer la source laser à balayage par une source à plus large bande. En effet, la résolution axiale obtenue grâce au sectionnement par cohérence de l'OCT est inversement proportionnelle à sa largeur de bande. Pour obtenir une résolution isotrope avec l'objectif 40X actuel, il faudrait une source de largeur  $\Delta\lambda \approx 580 \text{ nm}$ . Une telle largeur de bande nécessiterait le remplacement du laser à balayage par un laser Ti:Sapphire (Drexler, 2004). Une autre conséquence de la faible profondeur de champ de l'objectif 40X est qu'il est nécessaire d'ajuster la profondeur du plan focal manuellement afin d'obtenir un volume 3D avec l'OCM. La méthode actuelle ajuste la hauteur de l'échantillon avec le support motorisé. D'autres solutions, telles que l'utilisation d'une lentille à focale variable ou l'OCT de type maître-esclave, permettraient d'accélérer le mesurage.

Deux méthodes de sélection des ROIs ont été développées pour le 2R-SOCT (manuelle et automatique). Une troisième méthode supervisée serait une extension utile du système actuel. Elle consisterait en la préparation d'une carte d'acquisition pour guider la sélection des ROIs lors de l'acquisition. Cette carte pourrait être une segmentation manuelle des structures en utilisant un cerveau de souris moyen. Par la suite, durant la prise de mesures chaque tranche acquise avec le SOCT serait coregistrée sur le cerveau moyen pour détecter sa position, et les régions croisées dans la carte d'acquisition supervisée seraient utilisées pour générer des régions d'intérêts à imager avec le 40X. Un tel schéma d'acquisition supervisé pour le 2R-SOCT permettrait d'adapter le pipeline d'imagerie sérielle à diverses études de neuro-imagerie multimodale. Par exemple, des ROIs 40X ciblant uniquement des régions de croisement de fibres pourraient être imagés pour une expérience de validation dMRI.

### 6.3 Objectif 3

Le troisième objectif spécifique de cette thèse était la comparaison de l'OCT et de l'IRMd. Les données IRM ont permis de mieux comprendre l'origine du contraste en OCT pour les tissus neuronaux. Le premier article a comparé directement le contraste des fibres de matière blanche entre OCT et IRM de diffusion. Pour ce faire, une méthode de coregistration multimodale a été mise en place. La comparaison a révélé une dépendance entre le contraste OCT et l'orientation des fibres de matière blanche. Le contraste est plus faible lorsque les fibres sont parallèles à l'axe optique, et plus élevé lorsqu'elles sont orthogonales à celui-ci. Cette même relation a été observée pour l'atténuation. Ce résultat confirme des observations faites dans d'autres articles ayant étudié les tissus neuronaux avec l'OCT.

Dans le second article, la microstructure des tissus respectait bien les hypothèses de modélisation pour expliquer les variations de contrastes des métriques calculées. Des comparaisons qualitatives ont été faites entre les images OCM et les métriques issues de l'IRM, telles que la dispersion des orientations ou la densité apparente des fibres. Pour faire une comparaison quantitative, quelques étapes supplémentaires devaient être faites lors de l'analyse. D'abord, les données IRM et OCT ont été alignés sur un même repère en utilisant des transformations rigide et affine seulement. Ce choix de transformations a été fait pour éviter les déformations excessives introduites par une méthode d'alignement diffeomorphique. Ces erreurs d'alignement étaient dues à des portions de tissu manquantes et à une différence de contraste entre l'OCT et les autres modalités. Les structures n'étaient pas toutes visibles dans les données et la méthode de transformation diffeomorphique tentait donc d'aligner des structures qui ne sont pas les mêmes en réalité. Les erreurs d'alignement et la limitation aux transformations rigides et affines ont pour conséquence que les ROIs 40X ne sont pas toujours positionnées au bon endroit dans les données IRMd. Les erreurs semblaient être plus importantes près des extrémités antérieures et postérieures des cerveaux. Une étude a permis d'identifier ces régions (lobes olfactifs et cervelet) comme étant celles présentant le plus de déformations lors du processus d'histologie sériel (Castonguay et al., 2018). L'évaluation quantitative de la corrélation entre OCT haute résolution et l'IRM devra donc résoudre ces problèmes d'alignement.

Un autre facteur à considérer pour une analyse quantitative est la taille des images 40X. Les champs de vue pour les expériences étaient de  $0.5 \times 0.5 \times 0.25 \text{ mm}^3$ , ce qui représente environ  $4 \times 4 \times 2$  voxels

IRMd ayant une résolution isotropique de 125 microns. Pour évaluer la correspondance entre les images OCT et les voxels IRM, il faudrait donc sous-sectionner chaque volume OCM en blocs de 125 microns de largeur. De plus, un FOV de 0.5 mm est très large pour un objectif 40X, de sorte que plusieurs aberrations optiques et déformations spatiales sont présentes dans les images. Il faut donc tenir compte de ces effets lorsque les blocs OCM sont formés pour correspondre aux voxels IRM. Finalement, les mesures IRMd considèrent des voxels 3D, alors que l'analyse 3D des volumes OCM est limitée par l'anisotropie de la résolution optique due aux facteurs mentionnés précédemment, tels que la largeur de bande du laser et la faible profondeur de champ de l'objectif. Tout de même, les images acquises avec le système actuel pourraient être analysées en 2D afin, entre autres, d'estimer l'orientation 2D des fibres, les segmenter, calculer le diamètre ou la densité des amas de fibres à partir de la texture de l'image, ou pour détecter les corps cellulaires.

## CHAPITRE 7 CONCLUSION

L'intérêt croissant pour l'histologie sérielle en neurosciences s'explique par la nécessité de cartographier à haute résolution et dans des cerveaux entiers des phénomènes neurophysiologiques qui ne sont pas visibles à plus faible résolution avec les techniques d'imagerie conventionnelles. Le pipeline d'imagerie multirésolution, ainsi que les méthodes de reconstruction des données histologiques développées pour cette thèse, offre une nouvelle approche au dilemme entre résolution et quantité de données lors des études par histologie sérielle. Il s'agit également d'un outil fort utile pour étudier l'origine du contraste OCT dans le cerveau, à cause de la quantité phénoménale de données générées pour un seul échantillon et de la possibilité de valider les hypothèses avec d'autres modalités.

L'OCT permet d'acquérir rapidement et en 3D des images dont le contraste provient de la microstructure du tissu. Les propriétés optiques du tissu accessible à l'OCT sont les changements d'indices de réfraction, leur coefficient de diffusion et l'anisotropie de la diffusion. Pour obtenir des informations d'ordre moléculaire, il faudrait toutefois utiliser d'autres modalités optiques. Par exemple, pour cartographier le réseau vasculaire on pourrait utiliser un microscope 2-photons avec un agent de contraste injecté dans les vaisseaux sanguins. Une avenue possible pour le système d'imagerie développé au cours de ce doctorat serait de combiner l'OCT sériel avec un microscope 2-photons pour le second bras afin d'imager simultanément les cerveaux entiers avec ces deux modalités complémentaires. De plus, la modification du système OCT actuel pour le rendre sensible à la polarisation de la lumière permettrait d'évaluer l'orientation des fibres de matières blanche directement à partir de la biréfringence du tissu. Un tel système d'histologie sérielle multimodale présenterait plusieurs défis techniques au point de vue optique et d'analyse d'images, mais offrirait une opportunité unique pour étudier plusieurs neuropathologies, telles que la maladie d'Alzheimer, en permettant la colocalisation de la matière blanche et de la vasculature dans des cerveaux de souris entiers.

Comme dernière remarque, la quantité gigantesque de données générée par les systèmes d'histologie massive est à exploiter, par exemple en employant des réseaux de neurones profonds, des données d'histologie sérielle par OCT et leurs images IRM associées. Cela ouvre la voie à des projets d'analyse et d'intelligence machine qui permettraient de mieux comprendre le cerveau et l'origine du contraste OCT et IRM dans les tissus.

## BIBLIOGRAPHIE

- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., ... Goecks, J. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W3–W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
- Aguirre, A. D., Zhou, C., Lee, H.-C., Ahsen, O. O., & Fujimoto, J. G. (2015). Optical Coherence Microscopy. In *Optical Coherence Tomography* (pp. 865–911). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06419-2\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06419-2_29)
- Ahsen, O. O., Tao, Y. K., Potsaid, B. M., Sheikine, Y., Jiang, J., Grulkowski, I., ... Fujimoto, J. G. (2013). Swept source optical coherence microscopy using a 1310 nm VCSEL light source. *Optics Express*, 21(15), 18021. <https://doi.org/10.1364/OE.21.018021>
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., ... Walter, P. (2013). *Essential Cell Biology* (3d ed.). Garland Science.
- Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., & Field, A. S. (2007). Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*, 4(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>
- Alexander, D. C., Hubbard, P. L., Hall, M. G., Moore, E. A., Ptito, M., Parker, G. J. M., & Dyrby, T. B. (2010). Orientationally invariant indices of axon diameter and density from diffusion MRI. *NeuroImage*, 52(4), 1374–1389. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.05.043>
- Allen Institute. (2015). *Technical White Paper: Allen Mouse Common Coordinate Framework*.
- Allen Institute for Brain Science. (2016). *Allen mouse common coordinate framework* (Version 2).
- AllenInstitute. (2011). *Technical White Paper : In Situ Hybridization Data Production*. *Allen Mouse Brain Atlas* (Vol. 2).
- Amunts, K., Lepage, C., & Borgeat, L. (2013). BigBrain: an ultrahigh-resolution 3D human brain model. *Science*, 340(6139), 1472–1475. <https://doi.org/10.1126/science.1235381>
- Andersen, P. E., Jørgensen, T. M., Thrane, L., Tycho, A., & Yura, H. T. (2008). Modeling Light–Tissue Interaction in Optical Coherence Tomography Systems. In W. Drexler & J. G. Fujimoto (Eds.), *Optical Coherence Tomography - Technology and Applications* (pp. 73–115). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77550-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77550-8_3)
- Andersson, J. L. R., & Sotiropoulos, S. N. (2016). An integrated approach to correction for off-resonance effects and subject movement in diffusion MR imaging. *NeuroImage*, 125, 1063–



1078. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.10.019>
- Arridge, S. R., & Schotland, J. C. (2009). Optical tomography: forward and inverse problems. *Inverse Problems*, 25(12), 123010. <https://doi.org/10.1088/0266-5611/25/12/123010>
- Avants, B. B. (2017). Advanced normalization tools (ANTs). Github Repository.
- Avants, B. B., Epstein, C., Grossman, M., & Gee, J. C. (2008). Symmetric diffeomorphic image registration with cross-correlation: Evaluating automated labeling of elderly and neurodegenerative brain. *Medical Image Analysis*, 12(1), 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.media.2007.06.004>
- Avants, B. B., Tustison, N. J., Song, G., Cook, P. A., Klein, A., & Gee, J. C. (2011). A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration. *NeuroImage*, 54(3), 2033–2044. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.09.025>
- Avants, B. B., Tustison, N. J., Song, G., & Gee, J. C. (2009). ANTs: Open-Source Tools for Normalization And Neuroanatomy. *Heanet.Ie*, X(Xx), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12021-011-9109-y>
- Avants, B. B., Tustison, N. J., Wu, J., Cook, P. a, & Gee, J. C. (2011). An open source multivariate framework for n-tissue segmentation with evaluation on public data. *Neuroinformatics*, 9(4), 381–400. <https://doi.org/10.1007/s12021-011-9109-y>
- Avants, B. B., Yushkevich, P., Pluta, J., Minkoff, D., Korczykowski, M., Detre, J., & Gee, J. C. (2010). The optimal template effect in hippocampus studies of diseased populations. *NeuroImage*, 49(3), 2457–2466. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.062>
- Badea, A., Gewalt, S., Avants, B. B., Cook, J. J., & Johnson, G. A. (2012). Quantitative mouse brain phenotyping based on single and multispectral MR protocols. *NeuroImage*, 63(3), 1633–1645. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.021>
- Barrett, H. H., & Myers, K. J. (2003). *Foundations of Image Science* (1st ed.). Wiley-Interscience.
- Baumann, B. (2017). Polarization Sensitive Optical Coherence Tomography: A Review of Technology and Applications. *Applied Sciences*, 7(5), 474. <https://doi.org/10.3390/app7050474>
- Bégin, S., Dupont-Therrien, O., Bélanger, E., Daradich, A., Laffray, S., De Koninck, Y., & Côté, D. C. (2014). Automated method for the segmentation and morphometry of nerve fibers in large-scale CARS images of spinal cord tissue. *Biomedical Optics Express*, 5(12), 4145–4161. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.004145>

- Ben Arous, J., Binding, J., Léger, J.-F., Casado, M., Topilko, P., Gigan, S., ... Bourdieu, L. (2011). Single myelin fiber imaging in living rodents without labeling by deep optical coherence microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 16(11), 116012. <https://doi.org/10.1117/1.3650770>
- Bevilacqua, F., Piguet, D., Marquet, P., Gross, J. D., Tromberg, B. J., & Depeursinge, C. (1999). In vivo local determination of tissue optical properties: applications to human brain. *Applied Optics*, 38(22), 4939. <https://doi.org/10.1364/AO.38.004939>
- Blender Online Community. (2016). Blender - a 3D modelling and rendering package. Blender Foundation. Retrieved from <https://www.blender.org>
- Boas, D., Pitris, C., & Ramanujam, N. (2011). *Handbook of Biomedical Optics*. (D. A. Boas, P. Constantinos, & N. Ramanujam, Eds.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10951>
- Brad, A., Jingyu, W., Rivet, S., Podoleanu, A., Kapinchev, K., Barnes, F., ... Leick, L. (2016). *Master Slave Optical Coherence Tomography*.
- Brad, A., Rivet, S., & Podoleanu, A. (2016). Master/slave interferometry – ideal tool for coherence revival swept source optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 7(7), 2453. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.002453>
- Budde, M. D., & Frank, J. a. (2012). Examining brain microstructure using structure tensor analysis of histological sections. *NeuroImage*, 63(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.06.042>
- Calabrese, E., Badea, A., Cofer, G., Qi, Y., & Johnson, G. A. (2015). A Diffusion MRI Tractography Connectome of the Mouse Brain and Comparison with Neuronal Tracer Data. *Cerebral Cortex*, 25(11), 4628–4637. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv121>
- Calamante, F., Tournier, J.-D., Kurniawan, N. D., Yang, Z., Gyengesi, E., Galloway, G. J., ... Connelly, A. (2012). Super-resolution track-density imaging studies of mouse brain: comparison to histology. *NeuroImage*, 59(1), 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.014>
- Caruyer, E., Lenglet, C., Sapiro, G., & Deriche, R. (2013). Design of multishell sampling schemes with uniform coverage in diffusion MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 69(6), 1534–1540. <https://doi.org/10.1002/mrm.24736>
- Castonguay, A. (2017). *Histologie massive basée sur la microscopie à tomographie par cohérence optique*. École Polytechnique de Montréal.

- Castonguay, A., Avti, P. K., Moeini, M., Pouliot, P., Tabatabaei, M. S., Bélanger, S., & Lesage, F. (2015). Investigating the correlation between white matter and microvasculature changes in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. *SPIE BiOS*, 9328, 93281M. <https://doi.org/10.1117/12.2077830>
- Castonguay, A., Lefebvre, J., Lesage, F., & Pouliot, P. (2018). Comparing three-dimensional serial optical coherence tomography histology to MRI imaging in the entire mouse brain. *Journal of Biomedical Optics*, 23(01), 1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.1.016008>
- Castonguay, A., Lefebvre, J., Pouliot, P., Avti, P., Moeini, M., & Lesage, F. (2017). Serial optical coherence scanning reveals an association between cardiac function and the heart architecture in the aging rodent heart. *Biomedical Optics Express*, 8(11), 5027. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.005027>
- Castonguay, A., Lefebvre, J., Tardif, P.-L., Delafontaine-Martel, P., Pouliot, P., & Lesage, F. (2016). Serial OCT scanner : comparing 3D histology to In vivo imaging in the entire mouse brain. In *Society for Neuroscience, 2016* (pp. 1743–1744).
- Cernat, R., Bradu, A., Israelsen, N. M., Bang, O., Rivet, S., Keane, P. A., ... Podoleanu, A. (2017). Gabor fusion master slave optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 8(2), 813. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.000813>
- Choe, A. S., Stepniewska, I., Colvin, D. C., Ding, Z., & Anderson, A. W. (2012). Validation of diffusion tensor MRI in the central nervous system using light microscopy: Quantitative comparison of fiber properties. *NMR in Biomedicine*, 25(7), 900–908. <https://doi.org/10.1002/nbm.1810>
- Clark, C., & Werring, D. (2002). Diffusion tensor imaging in spinal cord: methods and applications - a review. *NMR in Biomedicine*, 578–586. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/nbm.788/full>
- Daducci, A., Canales-Rodríguez, E. J., Zhang, H., Dyrby, T. B., Alexander, D. C., & Thiran, J.-P. (2015). Accelerated Microstructure Imaging via Convex Optimization (AMICO) from diffusion MRI data. *NeuroImage*, 105, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.10.026>
- de Boer, J. F. (2015). Spectral/Fourier Domain Optical Coherence Tomography. In *Optical Coherence Tomography* (pp. 165–193). Cham: Springer International Publishing.

- [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06419-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06419-2_6)
- de Boer, J. F., Hitzenberger, C. K., & Yasuno, Y. (2017). Polarization sensitive optical coherence tomography – a review [Invited]. *Biomedical Optics Express*, 8(3), 1838. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.001838>
- Delafontaine-Martel, P. (2018). *Histologie sérielle afin d'étudier les changements de microvasculature dans la maladie d'Alzheimer*. École Polytechnique de Montréal.
- Delafontaine-Martel, P., Lefebvre, J., Tardif, P.-L., Lévy, B. I., Pouliot, P., & Lesage, F. (2018). Whole brain vascular imaging in a mouse model of Alzheimer's disease with two-photon microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 23(07), 1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.076501>
- Dell'Acqua, F., & Catani, M. (2012). Structural human brain networks. *Current Opinion in Neurology*, 1. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328355d544>
- Dell'Acqua, F., Simmons, A., Williams, S. C. R., & Catani, M. (2013). Can spherical deconvolution provide more information than fiber orientations? Hindrance modulated orientational anisotropy, a true-tract specific index to characterize white matter diffusion. *Human Brain Mapping*, 34(10), 2464–2483. <https://doi.org/10.1002/hbm.22080>
- Descoteaux, M. (2008). Mapping neuronal fiber crossings in the human brain. *SPIE Newsroom*. <https://doi.org/10.1117/2.1200807.1205>
- Descoteaux, M. (2015). High Angular Resolution Diffusion Imaging (HARDI). In *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*. <https://doi.org/10.1002/047134608X.W8258>
- Descoteaux, M., Deriche, R., Knösche, T. R., & Anwander, A. (2009). Deterministic and probabilistic tractography based on complex fibre orientation distributions. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 28(2), 269–286. <https://doi.org/10.1109/TMI.2008.2004424>
- Descoteaux, M., Wiest-Daesslé, N., Prima, S., Barillot, C., & Deriche, R. (2008). Impact of Rician Adapted Non-Local Means Filtering on HARDI (pp. 122–130). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85990-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85990-1_15)
- Docker Inc. (2017). Docker documentation. Docker.
- Dorr, A. E., Lerch, J. P., Spring, S., Kabani, N., & Henkelman, R. M. (2008). High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J

- mice. *NeuroImage*, 42(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.03.037>
- Drexler, W. (2004). Ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 9(1), 47. <https://doi.org/10.1117/1.1629679>
- Drexler, W., & Fujimoto, J. G. (Eds.). (2015). *Optical Coherence Tomography* (2nd ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06419-2>
- Drexler, W., Morgner, U., Kärtner, C. P., Boppart, S. a., Li, X. D., Ippen, E. P., & Fujimoto, J. G. (1999). In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Optics Letters*, 24(17), 1221–1223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1364/OL.24.001221>
- Dubois, A., Grieve, K., & Moneron, G. (2004). Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography. *Applied ...*, 43(14), 2875–2883. <https://doi.org/10.1364/AO.43.002874>
- Dubois, A., Vabre, L., Boccara, A.-C., & Beaurepaire, E. (2002). High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope. *Applied Optics*, 41(4), 805. <https://doi.org/10.1364/AO.41.000805>
- Dwork, N., Smith, G. T., Pauly, J. M., & Bowden, A. K. E. (2016). Automated Estimation of OCT Confocal Function Parameters from two B-Scans. In *Conference on Lasers and Electro-Optics* (Vol. 1, pp. 4–5). [https://doi.org/10.1364/CLEO\\_AT.2016.AW1O.4](https://doi.org/10.1364/CLEO_AT.2016.AW1O.4)
- Dyrby, T. B., Lundell, H., Burke, M. W., Reislev, N. L., Paulson, O. B., Ptito, M., & Siebner, H. R. (2014). Interpolation of diffusion weighted imaging datasets. *NeuroImage*, 103, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.09.005>
- Edrej, E., & Scarcelli, G. (2016). Optical imaging through dynamic turbid media using the Fourier-domain shower-curtain effect. *Optica*, 3(1), 583–592. <https://doi.org/10.1002/aur.1474.Replication>
- Fan, C., & Yao, G. (2013). Imaging myocardial fiber orientation using polarization sensitive optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 4(3), 460–465. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.000460>
- Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robbin, J.-C., Pujol, S., ... Kikinis, R. (2012). 3D slicers as an image computing platform for thw quantitative imaging network. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(9), 1323–1341. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.05.001.3D>
- Ferrante, E., & Paragios, N. (2017). Slice-to-volume medical image registration: A survey. *Medical Image Analysis*, 39, 101–123. <https://doi.org/10.1016/j.media.2017.04.010>

- Filippi, M. (Ed.). (2015). *Oxford Textbook of Neuroimaging*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780199664092.001.0001>
- Foroosh, H., Zerubia, J. B., & Berthod, M. (2002). Extension of phase correlation to subpixel registration. *IEEE Transactions on Image Processing*, 11(3), 188–200. <https://doi.org/10.1109/83.988953>
- Fu, D., Holtom, G., Freudiger, C., Zhang, X., & Xie, X. S. (2013). Hyperspectral Imaging with Stimulated Raman Scattering by Chirped Femtosecond Lasers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(16), 4634–4640. <https://doi.org/10.1021/jp308938t>
- Fu, Y., Huff, T. B., Wang, H.-W., Cheng, J.-X., & Wang, H. (2008). Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Express*, 16(24), 19396. <https://doi.org/10.1364/OE.16.019396>
- Gagnon, L., Sakad i, S., Lesage, F., Musacchia, J. J., Lefebvre, J., Fang, Q., ... Boas, D. A. (2015). Quantifying the Microvascular Origin of BOLD-fMRI from First Principles with Two-Photon Microscopy and an Oxygen-Sensitive Nanoprobe. *Journal of Neuroscience*, 35(8), 3663–3675. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3555-14.2015>
- Garyfallidis, E., Brett, M., Amirbekian, B., Rokem, A., van der Walt, S., Descoteaux, M., & Nimmo-Smith, I. (2014). Dipy, a library for the analysis of diffusion MRI data. *Frontiers in Neuroinformatics*, 8. <https://doi.org/10.3389/fninf.2014.00008>
- Gorgolewski, K., Burns, C. D., Madison, C., Clark, D., Halchenko, Y. O., Waskom, M. L., & Ghosh, S. S. (2011). Nipype: A Flexible, Lightweight and Extensible Neuroimaging Data Processing Framework in Python. *Frontiers in Neuroinformatics*, 5(August). <https://doi.org/10.3389/fninf.2011.00013>
- Hayworth, K. J., Xu, C. S., Lu, Z., Knott, G. W., Fetter, R. D., Tapia, J. C., ... Hess, H. F. (2015). Ultrastructurally smooth thick partitioning and volume stitching for large-scale connectomics. *Nature Methods*, 12(4). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3292>
- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2(12). <https://doi.org/10.1038/NMETH818>
- Hemenger, R. P. (1989). Birefringence of a medium of tenuous parallel cylinders. *Applied Optics*, 28(18), 4030–4034. <https://doi.org/10.1364/AO.28.004030>
- Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., & Bjartmar, C. (1993). Myelinated nerve fibres in the CNS. *Progress in Neurobiology*, 40(3), 319–384. <https://doi.org/10.1016/0301->

0082(93)90015-K

- Hillman, E. M. C. (2007). Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man. *Journal of Biomedical Optics*, 12(5), 051402. <https://doi.org/10.1117/1.2789693>
- Hohmann, M., Lengenfelder, B., Kanawade, R., Klämpfl, F., & Schmidt, M. (2015). Extension of depth-resolved reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography for slim samples. In *SPIE Biophotonics Japan* (Vol. 9792, p. 97920P). Tokyo, Japan. <https://doi.org/10.1117/12.2205030>
- Huang, D., Swanson, E. A., Lin, C. P., Schuman, J. S., Stinson, W. G., Chang, W., ... Fujimoto, J. G. (1991). Optical Coherence Tomography HHS Public Access. *Science*. November, 22(2545035), 1178–1181. <https://doi.org/10.1002/jcp.24872>.The
- Huber, R., Wojtkowski, M., Fujimoto, J. G., Jiang, J. Y., & Cable, A. E. (2005). Three-dimensional and C-mode OCT imaging with a compact, frequency swept laser source at 1300 nm. *Optics Express*, 13(26), 10523–10538. <https://doi.org/10.1364/OPEX.13.010523>
- Hughes, D., & Duck, F. (1997). Automatic attenuation compensation for ultrasonic imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 23(5), 651–664. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562997000021>
- Izatt, J. A., Choma, M. A., & Dhalla, A.-H. (2015). Theory of Optical Coherence Tomography. In *Optical Coherence Tomography* (2nd ed., pp. 65–94). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06419-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06419-2_3)
- Jacques, S. L. (2013). Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine and Biology*, 58(11), R37-61. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/11/R37>
- Jeon, S. W., Shure, M. A., Baker, K. B., Huang, D., Rollins, A. M., Chahlavi, A., & Rezai, A. R. (2006). A feasibility study of optical coherence tomography for guiding deep brain probes. *Journal of Neuroscience Methods*, 154(1–2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.12.008>
- Jespersen, S. N., Bjarkam, C. R., Nyengaard, J. R., Chakravarty, M. M., Hansen, B., Vosegaard, T., ... Vestergaard-Poulsen, P. (2010). Neurite density from magnetic resonance diffusion measurements at ultrahigh field: Comparison with light microscopy and electron microscopy. *NeuroImage*, 49(1), 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.08.053>
- Jian, Z., Yu, L., Rao, B., Tromberg, B. J., & Chen, Z. (2010). Three-dimensional speckle suppression in optical coherence tomography based on the curvelet transform. *Optics Express*,

- 18(2), 1024. <https://doi.org/10.1364/OE.18.001024>
- Jiang, Y., & Johnson, G. A. (2010). Microscopic diffusion tensor imaging of the mouse brain. *NeuroImage*, 50(2), 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.12.057>
- Jones, A. R., Overly, C. C., & Sunkin, S. M. (2009). The Allen Brain Atlas: 5 years and beyond. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(11), 821–828. <https://doi.org/10.1038/nrn2722>
- Jones, D. K. (2010). Challenges and limitations of quantifying brain connectivity in vivo with diffusion MRI. *Imaging in Medicine*, 2(3), 341–355. <https://doi.org/10.2217/IIM.10.21>
- Jones, D. K., Horsfield, M. A., & Simmons, A. (1999). Optimal strategies for measuring diffusion in anisotropic systems by magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 42(3), 515–525. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2594\(199909\)42:3<515::AID-MRM14>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2594(199909)42:3<515::AID-MRM14>3.0.CO;2-Q)
- Jones, P. W. (1999). First- and Second-Order Conservative Remapping Schemes for Grids in Spherical Coordinates. *Monthly Weather Review*, 127(9), 2204–2210. [https://doi.org/10.1175/1520-0493\(1999\)127<2204:FASOCR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1999)127<2204:FASOCR>2.0.CO;2)
- JoVE. (2018). Histological Staining of Neural Tissue. JoVE.
- Khan, A. R., Cornea, A., Leigland, L. A., Kohama, S. G., Jespersen, S. N., & Kroenke, C. D. (2015). 3D structure tensor analysis of light microscopy data for validating diffusion MRI. *NeuroImage*, 111, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.01.061>
- Kim, M. K. (2010). Principles and techniques of digital holographic microscopy. *Journal of Photonics for Energy*, 018005. <https://doi.org/10.1117/6.0000006>
- Klein, A., , Jesper Andersson, Babak A. Ardekani, John Ashburner, B. A., Ming-Chang Chiang, Gary E. Christensen, D. L. C., Gee, J., Hellier, P., Joo Hyun Song, Mark Jenkinson, C. L., ... Tom Vercauteren, Roger P. Woods, J. John Mann, and R. V. P. (2009). Evaluation of 14 nonlinear deformation algorithms applied to human brain MRI registration. *Neuroimage*, 46(3), 786–802. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.12.037>.Evaluation
- Kleinfeld, D., Bharioke, A., Blinder, P., Bock, D. D., Briggman, K. L., Chklovskii, D. B., ... Sakmann, B. (2011). Large-Scale Automated Histology in the Pursuit of Connectomes. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16125–16138. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4077-11.2011>
- Klüver, H., & Barrera, E. (1953). A Method for the Combined Staining of Cells and Fibers in the Nervous System. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 12(4), 400–403.



- Kreher, B. W., Mader, I., & Kiselev, V. G. (2008). Gibbs tracking: a novel approach for the reconstruction of neuronal pathways. *Magnetic Resonance in Medicine*, 60(4), 953–963. <https://doi.org/10.1002/mrm.21749>
- Kremer, A., Lippens, S., Bartunkova, S., Aseelbergh, B., Blanplain, C., Fendrych, M., ... Guérin, C. J. (2015). Developing 3D SEM in a broad biological context. *Journal of Microscopy*, 259(2), 80–96. <https://doi.org/10.1111/jmi.12211>
- Kuan, L., Li, Y., Lau, C., Feng, D., Bernard, A., Sunkin, S. M., ... Ng, L. (2015). Neuroinformatics of the allen mouse brain connectivity atlas. *Methods*, 73, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.013>
- Kutuzov, N. P., Brazhe, A. R., Lyaskovskiy, V. L., & Maksimov, G. V. (2015). Laser beam coupling into nerve fiber myelin allows one to assess its structural membrane properties. *Journal of Biomedical Optics*, 20(5). <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.5.050501>
- Kutuzov, N. P., Brazhe, A. R., Maksimov, G. V., Dracheva, O. E., Lyaskovskiy, V. L., Bulygin, F. V., & Rubin, A. B. (2014). Orientational ordering of carotenoids in myelin membranes resolved by polarized Raman microspectroscopy. *Biophysical Journal*, 107(4), 891–900. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.002>
- Lakshminarayanan, V., & Fleck, A. (2011). Zernike polynomials: a guide. *Journal of Modern Optics*, 58(7), 545–561. <https://doi.org/10.1080/09500340.2011.554896>
- Leahy, C., Radhakrishnan, H., & Srinivasan, V. J. (2013). Volumetric imaging and quantification of cytoarchitecture and myeloarchitecture with intrinsic scattering contrast. *Biomedical Optics Express*, 4(10), 1913–1978. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001978>
- Leergaard, T. B., White, N. S., de Crespigny, A., Bolstad, I., D’Arceuil, H., Bjaalie, J. G., & Dale, A. M. (2010). Quantitative histological validation of diffusion MRI fiber orientation distributions in the rat brain. *PloS One*, 5(1), e8595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008595>
- Lefebvre, J. (2014). *Développement d’outils de vectorisation d’angiographies obtenues par microscopie 2-photons dans le contexte du vieillissement du cerveau*. École Polytechnique de Montréal.
- Lefebvre, J., Castonguay, A., & Lesage, F. (2017a). OCT Mouse Brain Templates. Mendeley Data. <https://doi.org/10.17632/33wfgxmp8.1>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., & Lesage, F. (2017b). White matter segmentation by estimating

- tissue optical attenuation from volumetric OCT massive histology of whole rodent brains. In T. G. Brown, C. J. Cogswell, & T. Wilson (Eds.), *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* (Vol. 10070, p. 1007012). <https://doi.org/10.1117/12.2251173>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., & Lesage, F. (2018). Imaging whole mouse brains with a dual resolution serial swept-source optical coherence tomography scanner. In *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* (Vol. 10481). <https://doi.org/10.1117/12.2288521>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., Pouliot, P., Descoteaux, M., & Lesage, F. (2017). Whole mouse brain imaging using optical coherence tomography: reconstruction, normalization, segmentation, and comparison with diffusion MRI. *Neurophotonics*, 4(4), 41501. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.4.4.041501>
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., ... Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168–176. <https://doi.org/10.1038/nature05453>
- Leitgeb, R. a., Drexler, W., Povazay, B., Hermann, B., Sattmann, H., & Fercher, A. F. (2005). Spectroscopic Fourier Domain Optical Coherence Tomography: Principle, Limitations and applications. *Spie*, 5690, 151–158. <https://doi.org/10.1117/12.592911>
- Lenz, M., Krug, R., Dillmann, C., Gerling, A., Gerhardt, N. C., Welp, H., ... Hofmann, M. R. (2017). Spectroscopic optical coherence tomography for ex vivo brain tumor analysis. *Proc of SPIE*, 10054(0049), 100540L. <https://doi.org/10.1117/12.2252141>
- Lesage, F. (2017). LIOM - Shared resources. Retrieved June 28, 2017, from [http://liom2.polymtl.ca/en/shared\\_resources](http://liom2.polymtl.ca/en/shared_resources)
- Lesage, F., Castonguay, A., Tardif, P. L. L., Lefebvre, J., & Li, B. (2015). Investigating the impact of blood pressure increase to the brain using high resolution serial histology and image processing. In *Wavelets and Sparsity XVI* (Vol. 9597, p. 95970M). San Diego, CA: SPIE Proceedings. <https://doi.org/10.1117/12.2189110>
- LeVeque, R. J. (2007). *Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations*. Society for Industrial and Applied Mathematics. <https://doi.org/10.1137/1.9780898717839>
- Levitz, D., Thrane, L., Frosz, M. H., Andersen, P. E., Andersen, C. B., Andersson-Engels, S., ... Hansen, P. R. (2004). Determination of optical scattering properties of highly-scattering media in optical coherence tomography images. *Optics Express*, 12(2), 249.

- <https://doi.org/10.1364/OPEX.12.000249>
- Lewis, J. P. (1995). Fast Normalized Cross-Correlation. *Vision Interface*, 95(120123), 15–19. <https://doi.org/10.1007/s00034-009-9130-7>
- Li, C., & Tam, P. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters*, 19(8), 771–776. [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(98)00057-9)
- Lippok, N., Coen, S., Nielsen, P., & Vanholsbeeck, F. (2012). Dispersion compensation in Fourier domain optical coherence tomography using the fractional Fourier transform. *Optics Express*, 20(21), 23398. <https://doi.org/10.1364/OE.20.023398>
- Liu, C. J., Williams, K. E., Orr, H. T., & Akkin, T. (2016). Visualizing and mapping the cerebellum with serial optical coherence scanner. *Neurophotonics*, 4(1), 011006. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.4.1.011006>
- Magnain, C., Augustinack, J. C., Reuter, M., Wachinger, C., Frosch, M. P., Ragan, T., ... Fischl, B. (2014). Blockface histology with optical coherence tomography: A comparison with Nissl staining. *NeuroImage*, 84, 524–533. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.072>
- Marks, D. L., Oldenburg, A. L., Reynolds, J. J., & Boppart, S. A. (2003). Autofocus algorithm for dispersion correction in optical coherence tomography. *Applied Optics*. <https://doi.org/10.1364/AO.42.003038>
- Marks, D. L., Ralston, T. S., Carney, P. S., & Boppart, S. a. (2007). High numerical aperture full-field optical coherence tomography with space-invariant resolution without scanning the focus. *Proceedings of SPIE*, 6429, 64291R–64291R–9. <https://doi.org/10.1117/12.703372>
- Mayerich, D., Kwon, J., & Choe, Y. (2008). Constructing high resolution microvascular models. *Third Workshop on Microscopic Image Analysis with Applications in Biology*. Retrieved from <http://www.miaab.org/miaab-2008-papers/04-miaab-2008-paper-03.pdf>
- Mescher, A. L., & Junqueira, L. C. U. (2013). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 13th Edition*. (N. Y. : M.-H. Medical, Ed.) (13th ed.).
- Mollink, J., Kleinnijenhuis, M., Cappellen van Walsum, A.-M. van, Sotiropoulos, S. N., Cottaar, M., Mirfin, C., ... Miller, K. L. (2017). Evaluating fibre orientation dispersion in white matter: Comparison of diffusion MRI, histology and polarized light imaging. *NeuroImage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.06.001>
- Morgner, U., Drexler, W., Kärtner, F. X., Pitris C., X. D. L., Ippen, E. P., Fujimoto, J. G., ... Pitris, C. (2000). Spectroscopic optical coherence tomography. *Optics Letters*, 25(2), 111–113.

<https://doi.org/10.1364/OL.25.000111>

- Moseley, M. (2002). Diffusion tensor imaging and aging—a review. *NMR in Biomedicine*, 15(7–8), 553–560. <https://doi.org/10.1002/nbm.785>
- Murali, S., & Rolland, J. (2007). Dynamic-focusing microscope objective for optical coherence tomography. In G. G. Gregory, J. M. Howard, & R. J. Koshel (Eds.) (p. 63420H). <https://doi.org/10.1117/12.692205>
- Oh, S. W., Harris, J. a., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., ... Zeng, H. (2014a). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., ... Zeng, H. (2014b). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... Duchesnay, É. (2012). Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12, 2825–2830. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Preibisch, S., Saalfeld, S., & Tomancak, P. (2008). Fast stitching of large 3d biological datasets. In *Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference*. Retrieved from <http://becherovka.mpi-cbg.de/~preibisch/pubs/imagejpaper2008.pdf%5Cnfile:///Users/franco/Documents/Papers2/Articles/Unknown/Proceedings of the ImageJ ?/Preibisch/Proceedings of the ImageJ ? Fast stitching of large 3d biological datasets.pdf%5Cnpapers2://>
- Price, D. L., Chow, S. K., MacLean, N. A. B., Hakoziaki, H., Peltier, S., Martone, M. E., & Ellisman, M. H. (2006). High-resolution large-scale mosaic imaging using multiphoton microscopy to characterize transgenic mouse models of human neurological disorders. *Neuroinformatics*, 4(1), 65–80. <https://doi.org/10.1385/NI>
- Raffelt, D., Tournier, J.-D., Rose, S., Ridgway, G. R., Henderson, R., Crozier, S., ... Connelly, A. (2012). Apparent Fibre Density: A novel measure for the analysis of diffusion-weighted magnetic resonance images. *NeuroImage*, 59(4), 3976–3994. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.10.045>
- Ragan, T., Kadiri, L. R., Venkataraju, K. U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., ... Osten, P. (2012). Serial two-photon tomography: an automated method for ex-vivo mouse brain

- imaging. *Nature Methods*, 9(3), 255–258. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1854>. Serial
- Ralston, T. S., Marks, D. L., Kamalabadi, F., & Boppart, S. A. (2005). Deconvolution methods for mitigation of transverse blurring in optical coherence tomography. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14(9), 1254–1264. <https://doi.org/10.1109/TIP.2005.852469>
- Ralston, T. S., Marks, D. L., Scott Carney, P., & Boppart, S. a. (2007). Interferometric synthetic aperture microscopy. *Nature Physics*, 3(2), 129–134. <https://doi.org/10.1038/nphys514>
- Rankov, V., Locke, R. J., Edens, R. J., Barber, P. R., & Vojnovic, B. (2005). An algorithm for image stitching and blending. In *Biomedical Optics 2005* (Vol. 5701, pp. 190–199). International Society for Optics and Photonics. Retrieved from <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=859158>
- Reuters, T. (2012). Web of Sciences. Retrieved July 19, 2018, from <https://apps.webofknowledge.com>
- Rolland, J. P., Meemon, P., Murali, S., Thompson, K. P., & Lee, K. (2010). Gabor-based fusion technique for Optical Coherence Microscopy. *Optics Express*, 18(4), 3632. <https://doi.org/10.1364/OE.18.003632>
- Sakadžić, S., Mandeville, E. T., Gagnon, L., Musacchia, J. J., Yaseen, M. a, Yucel, M. a, ... Boas, D. a. (2014). Large arteriolar component of oxygen delivery implies a safe margin of oxygen supply to cerebral tissue. *Nature Communications*, 5, 5734. <https://doi.org/10.1038/ncomms6734>
- Salo, R. A., Belevich, I., Manninen, E., Jokitalo, E., Gröhn, O., & Sierra, A. (2018). Quantification of anisotropy and orientation in 3D electron microscopy and diffusion tensor imaging in injured rat brain. *NeuroImage*, 172(September 2017), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.01.087>
- Sandell, J. L., & Zhu, T. C. (2011). A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *Journal of Biophotonics*, 4(11–12), 773–787. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100062>
- Schain, A. J., Hill, R. A., & Grutzendler, J. (2014). Label-free in vivo imaging of myelinated axons in health and disease with spectral confocal reflectance microscopy. *Nature Medicine*, 20(4), 443–449. <https://doi.org/10.1038/nm.3495>
- Schilling, K. G., Janve, V., Gao, Y., Stepniewska, I., Landman, B. A., & Anderson, A. W. (2017). Histological validation of diffusion MRI fiber orientation distributions and dispersion.

- NeuroImage*, 165(August 2017), 200–221. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.10.046>
- Schilling, K., Janve, V., Gao, Y., Stepniewska, I., Landman, B. A., & Anderson, A. W. (2016). Comparison of 3D orientation distribution functions measured with confocal microscopy and diffusion MRI. *NeuroImage*, 129, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.01.022>
- Scikit-Learn Online Community. (2017). Gaussian mixture model selection. Scikit-Learn Documentation. Retrieved from [http://scikit-learn.org/%0Dstable/auto\\_examples/mixture/plot\\_gmm\\_selection.html](http://scikit-learn.org/%0Dstable/auto_examples/mixture/plot_gmm_selection.html)
- Shatil, A. S., Matsuda, K. M., & Figley, C. R. (2016). A Method for Whole Brain Ex Vivo Magnetic Resonance Imaging with Minimal Susceptibility Artifacts. *Frontiers in Neurology*, 7(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00208>
- Smith, G. T., Dwork, N., O’Conner, D., Sikora, U., Lurie, K. L., Pauly, J. M., & Ellerbee, A. K. (2015). Automated, Depth Resolved Estimation of Attenuation Coefficient From Optical Coherence Tomography Data. *IEEE Transactions in Medical Imaging*, 34(12), 2592–2602. <https://doi.org/10.1109/TMI.2015.2450197>
- Sotak, C. (2002). The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain injury—a review. *NMR in Biomedicine*, 15(7–8), 561–569. <https://doi.org/10.1002/nbm.786>
- Spijker, S. (2011). Dissection of Rodent Brain Regions (Vol. 57, pp. 13–26). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-111-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-111-6_2)
- Srinivasan, V. J., Atochin, D. N., Radhakrishnan, H., Jiang, J. Y., Ruvinskaya, S., Wu, W., ... Boas, D. a. (2011). Optical coherence tomography for the quantitative study of cerebrovascular physiology. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), 1339–1345. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.19>
- Srinivasan, V. J., Radhakrishnan, H., Jiang, J. Y., Barry, S., & Cable, A. E. (2012). Optical coherence microscopy for deep tissue imaging of the cerebral cortex with intrinsic contrast. *Optics Express*, 20(3), 2220. <https://doi.org/10.1364/OE.20.002220>
- Stikov, N., Campbell, J. S. W., Stroh, T., Lavelée, M., Frey, S., Novek, J., ... Pike, G. B. (2015). Quantitative analysis of the myelin g -ratio from electron microscopy images of the macaque corpus callosum. *Data in Brief*, 4, 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.05.019>
- Sultan, F. (2013). Dissection of Different Areas from Mouse Hippocampus. *BIO-PROTOCOL*, 3(21). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.955>

- Szeliski, R. (2006). Image alignment and stitching: A tutorial. *Foundations and Trends® in Computer Graphics and ...*, 273–292. Retrieved from <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1295185>
- Tardif, P.-L. (2018). *Validation de l'imagerie intravasculaire par tomographie par cohérence optique sérielle et microscopie confocale en fluorescence*. École Polytechnique de Montréal.
- Tardif, P. L., Bertrand, M. J., Abran, M., Castonguay, A., Lefebvre, J., St?hli, B. E., ... Lesage, F. (2016). Validating intravascular imaging with serial optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17122110>
- Thrane, L., Frosz, M. H., Jørgensen, T. M., Tycho, A., Yura, H. T., & Andersen, P. E. (2004). Extraction of optical scattering parameters and attenuation compensation in optical coherence tomography images of multilayered tissue structures. *Optics Letters*, 29(14), 1641. <https://doi.org/10.1364/OL.29.001641>
- Tomaževič, D., Likar, B., & Pernuš, F. (2002). Comparative evaluation of retrospective shading correction methods. *Journal of Microscopy*, 208(3), 212–223. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2002.01079.x>
- Tournier, J.-D., Calamante, F., & Connelly, A. (2007). Robust determination of the fibre orientation distribution in diffusion MRI: Non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. *NeuroImage*, 35(4), 1459–1472. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.016>
- Tournier, J.-D., Mori, S., & Leemans, A. (2011). Diffusion tensor imaging and beyond. *Magnetic Resonance in Medicine : Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 65(6), 1532–1556. <https://doi.org/10.1002/mrm.22924>
- Träger, F. (Ed.). (2012). *Springer Handbook of Lasers and Optics* (2nd ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19409-2>
- Tremblay, G., Bernier, R., & Roy, G. (2015). The shower curtain effect paradoxes, 9641, 964107. <https://doi.org/10.1117/12.2194837>
- Tuchin, V. V. (2015). *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (3rd ed.). Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). <https://doi.org/10.1117/3.1003040>

- Turchin, I. V., Sergeeva, E. a., Dolin, L. S., Kamensky, V. a., Shakhova, N. M., & Richards-Kortum, R. (2005). Novel algorithm of processing optical coherence tomography images for differentiation of biological tissue pathologies. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6), 064024. <https://doi.org/10.1117/1.2137670>
- Tustison, N. J., Avants, B. B., Cook, P. a, Yuanjie Zheng, Egan, A., Yushkevich, P. a, & Gee, J. C. (2010). N4ITK: Improved N3 Bias Correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(6), 1310–1320. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2046908>
- Uchiyama, T. (2007). Silver diagnosis in neuropathology: Principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathologica*, 113(5), 483–499. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0200-2>
- Ugryumova, N., Matcher, S. J., & Attenburrow, D. P. (2004). Measurement of bone mineral density via light scattering. *Physics in Medicine and Biology*, 49(3), 469–483. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/3/009>
- van Gemert, M. J., Jacques, S. L., Sterenborg, H. J., & Star, W. M. (1989). Skin optics. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 36(12), 1146–1154. <https://doi.org/10.1109/10.42108>
- van Leeuwen, T. G., Faber, D. J., & Aalders, M. C. (2003). Measurement of the axial point spread function in scattering media using single-mode fiber-based optical coherence tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 9(2), 227–233. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2003.813299>
- Vandenberghe, M. E., Hérard, A.-S., Souedet, N., Sadouni, E., Santin, M. D., Briet, D., ... Delzescaux, T. (2016). High-throughput 3D whole-brain quantitative histopathology in rodents. *Scientific Reports (in Revision)*, (January 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep20958>
- Vermeer, K. a, Mo, J., Weda, J. J. a, Lemij, H. G., & de Boer, J. F. (2014). Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 5(1), 322. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.000322>
- Wang, H., Akkin, T., Magnain, C., Wang, R., Dubb, J., Kostis, W. J., ... Boas, D. (2016). Polarization sensitive optical coherence microscopy for brain imaging. *Optics Letters*, 41(10), 2213–2216. <https://doi.org/10.1364/OL.41.002213>
- Wang, H., Black, A. J., Zhu, J., Stigen, T. W., Al-Qaisi, M. K., Netoff, T. I., ... Akkin, T. (2011).



- Reconstructing micrometer-scale fiber pathways in the brain: Multi-contrast optical coherence tomography based tractography. *NeuroImage*, 58(4), 984–992. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.005>
- Wang, H., Lenglet, C., & Akkin, T. (2015). Structure tensor analysis of serial optical coherence scanner images for mapping fiber orientations and tractography in the brain. *Journal of Biomedical Optics*, 20(3), 036003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.3.036003>
- Wang, H., Magnain, C., Sakadžić, S., Fischl, B., Boas, D. A., C Cauberg, E. C., ... Li, X. (2017). Characterizing the optical properties of human brain tissue with high numerical aperture optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 8(12), 5617–5636. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.005617>
- Wang, H., Magnain, C., Wang, R., Dubb, J., Varjabedian, A., Tirrell, L. S., ... Boas, D. A. (2018). as -PSOCT: Volumetric microscopic imaging of human brain architecture and connectivity. *NeuroImage*, 165, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.10.012>
- Wang, H., Zhu, J., & Akkin, T. (2014). Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *NeuroImage*, 84, 1007–1017. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.09.063>
- Wang, H., Zhu, J., Reuter, M., Vinke, L. N., Yendiki, A., Boas, D. A., ... Akkin, T. (2014). Cross-validation of serial optical coherence scanning and diffusion tensor imaging: A study on neural fiber maps in human medulla oblongata. *NeuroImage*, 100, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.06.032>
- Wang, R. K. (2007). Fourier domain optical coherence tomography achieves full range complex imaging in vivo by introducing a carrier frequency during scanning. *Physics in Medicine and Biology*, 52(19), 5897–5907. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/19/011>
- Wang, L. V., & Wu, H.-I. (2007). *Biomedical Optics : Principles and Imaging*. Hoboken, NJ, USA: Wiley Interscience.
- Wang, Y., & Yao, G. (2013). Optical tractography of the mouse heart using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 4(11), 2540–2545. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.002540>
- Wojtkowski, M., Srinivasan, V. J., Ko, T. H., Fujimoto, J. G., Kowalczyk, A., & Duker, J. S. (2004). Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation. *Optics Express*, 12(11), 2404.

<https://doi.org/10.1364/OPEX.12.002404>

- Wong, T. T. W., Zhang, R., Zhang, C., Hsu, H.-C., Maslov, K. I., Wang, L. V. L., ... Wang, L. V. L. (2017). Label-free automated three-dimensional imaging of whole organs by microtomy-assisted photoacoustic microscopy. *Nature Communications*, 8(1), 1386. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01649-3>
- Wouterlood, F. G. (2012). *Cellular Imaging Techniques for Neuroscience and Beyond* (1st ed.). Academic Press. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/cellular-imaging-techniques-for-neuroscience-and-beyond/wouterlood/978-0-12-385872-6>
- Wu, T., Ding, Z., Wang, C., & Chen, M. (2011). Full-range swept source optical coherence tomography based on carrier frequency by transmissive dispersive optical delay line. *Journal of Biomedical Optics*, 16(12). <https://doi.org/10.1117/1.3662450>
- Xu, C., Vinegoni, C., Ralston, T. S., Luo, W., Tan, W., & Boppart, S. A. (2006). Spectroscopic spectral-domain optical coherence microscopy. *Optics Letters*, 31(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1364/OL.31.001079>
- Yi, J., & Backman, V. (2012). Imaging a full set of optical scattering properties of biological tissue by inverse spectroscopic optical coherence tomography. *Optics Letters*, 37(21), 4443–4445. <https://doi.org/10.1364/OL.37.004443>
- Yushkevich, P. A., Piven, J., Hazlett, H. C., Smith, R. G., Ho, S., Gee, J. C., & Gerig, G. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage*, 31(3), 1116–1128. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.015>
- Zhang, H., Schneider, T., Wheeler-Kingshott, C. A., & Alexander, D. C. (2012). NODDI: Practical in vivo neurite orientation dispersion and density imaging of the human brain. *NeuroImage*, 61(4), 1000–1016. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.072>